

Elektrophoretische Untersuchungen
über Reaktionen von Primär- und Sekundärradikalen
mit Rinderserumalbumin

Diss Erlangen 1903

von

Konrad Freundl

aus

Tirschenreuth



Aus dem Institut für Radiologie
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. phil. nat. H. Pauly

Elektrophoretische Untersuchungen über Reaktionen von Primär- und Sekundärradikalen mit Rinderserumalbumin

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich - Alexander - Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt

von

Konrad Freundl

aus

Tirschenreuth

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Prof. Dr. V. Becker

Referent: Prof. Dr. H. Schüßler

Korreferent: Prof. Dr. Dr. H. Pauly

Tag der mündlichen Prüfung: 27. 06. 1983

INHALTSÜBERSICHT

	Seite
1. Einleitung.....	1
1.1. Allgemeiner Überblick.....	1
1.2. Problemstellung.....	3
2. Experimenteller Teil.....	5
2.1. Geräte und Materialien.....	5
2.1.1. Geräte.....	5
2.1.2. Materialien.....	6
2.2. Methoden.....	8
2.2.1. Proteinlösung.....	8
2.2.2. Bestrahlung.....	10
2.2.2.1. Versuchsanordnung.....	10
2.2.2.2. Durchführung.....	12
2.2.2.3. Weiterverarbeitung.....	13
2.2.3. Gele.....	14
2.2.4. Elektrophorese.....	16
2.2.5. Färben.....	19
2.2.6. Entfärben.....	19
2.2.7. Photometrische Auswertung.....	20
2.2.8. Flächenauswertung.....	22
2.2.8.1. Eingabe in den Rechner.....	22
2.2.8.2. Abgrenzung der Peaks.....	23
2.2.8.3. Flächenberechnung.....	23
2.2.8.4. Korrektur der Daten.....	24
2.2.8.5. Zeichnungen.....	25
2.2.9. Eichkurven.....	27
3. Ergebnisse.....	28
3.1. Allgemeine Bemerkungen.....	28

3.2. Bestrahlung von Serumalbumin unter	
N_2O -Gas.....	28
3.2.1. Radikale.....	28
3.2.2. Bestrahlung bei einem pH-Wert	
von 6.3.....	30
3.2.2.1. Deskriptive Auswertung der	
Elektropherogramme.....	30
3.2.2.2. Flächen-/Dosisverhalten der	
Peaks.....	33
3.2.3. Bestrahlung bei einem pH-Wert	
von 8.2.....	43
3.2.3.1. Deskriptive Auswertung der	
Elektropherogramme.....	43
3.2.3.2. Flächen-/Dosisverhalten der	
Peaks.....	47
3.3. Bestrahlung von Serumalbumin unter	
N_2O -Gas mit Zusatz von Formiat.....	52
3.3.1. Radikale.....	52
3.3.2. Bestrahlung bei pH 6.3.....	53
3.3.2.1. Elektropherogramme der Ver-	
suchsreihe ohne Reduktion.....	53
3.3.2.2. Flächen-/Dosiskurven der Ver-	
suchsreihe ohne Reduktion.....	56
3.3.2.3. Elektropherogramme der Ver-	
suchsreihe mit Reduktion.....	61
3.3.2.4. Flächen-/Dosiskurven der Ver-	
suchsreihe mit Reduktion.....	62
3.3.3. Bestrahlung bei pH 8.2.....	67
3.3.3.1. Deskriptive Auswertung der	
Elektropherogramme.....	67
3.3.3.2. Flächen-/Dosiskurven der Peaks.	71
3.4. Bestrahlung von Serumalbumin unter	
N_2O -Gas mit Zusatz von Äthanol.....	78
3.4.1. Radikale.....	78

3.4.2. Bestrahlung bei pH 6.3.....	78
3.4.2.1. Deskriptive Auswertung der Elektropherogramme.....	78
3.4.2.2. Flächen-/Dosiskurven.....	81
3.4.3. Bestrahlung bei pH 8.2.....	86
3.4.3.1. Deskriptive Auswertung der Elektropherogramme.....	86
3.4.3.2. Flächen-/Dosiskurven.....	89
3.5. Eichgeraden.....	91
4. Diskussion.....	96
4.1. Methodische Grundlagen.....	96
4.2. Bestrahlung unter N ₂ O-Gas.....	99
4.2.1. Reaktionen der OH-Radikale mit Aminosäuren.....	101
4.2.2. Reaktionen der OH-Radikale mit der Peptid-Bindung.....	105
4.2.3. Reaktionen der OH-Radikale mit Proteinen.....	107
4.3. Bestrahlung in Gegenwart von organischen Radikalen.....	111
4.4. pH-Abhängigkeit der Reaktionen und Aggregatverhalten.....	123
4.5. Wertung.....	128
5. Zusammenfassung.....	130
6. Literaturverzeichnis.....	132
7. Anhang.....	136
(Beschreibung des Korrekturprogramms)	



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546202_0003

1. Einleitung

1.1. Allgemeiner Überblick

Die Entdeckung der Röntgenstrahlen durch Konrad Wilhelm Röntgen im Jahre 1895 stellt ohne jeden Zweifel eine bedeutende Wende für die Medizin dar. Wie groß sie ist, zeigt die weite Verbreitung von Röntgengeräten als Basis einer modernen medizinischen Diagnostik.

Einen bisherigen Höhepunkt erreichte diese Entwicklung mit der Einführung der Computer-Tomographie, deren Wichtigkeit nicht zuletzt die Verleihung des Nobelpreises an ihre Begründer im Jahre 1980 unterstreicht.

Doch nicht nur für die Diagnostik leisten Röntgenstrahlen eine wertvolle Hilfe, die Medizin lernte, sie auch für therapeutische Zwecke einzusetzen. Dies geschieht, zum Beispiel, in Form von Oberflächentherapie in der Dermatologie, oder auch, zusammen mit der Nutzung von radioaktiven Strahlungsquellen, zur Behandlung tieferliegender maligner Geschwülste des Menschen.

Parallel zu dieser Entwicklung, und sicherlich auch etwas der allgemeinen Aufmerksamkeit entzogen, verlief die Forschung zweier Fachgebiete, der Strahlenchemie und der Strahlenbiologie, die sich im molekularen und zellulären Bereich mit der Wirkung von Röntgenstrahlen, oder allgemein, ionisierender Strahlung, beschäftigten. Schon früh erkannte man dort, daß grundsätzlich zwischen zwei Wechselwirkungen einer ionisierenden Strahlung mit der bestrahlten Materie unterschieden werden kann, nämlich der direk-



ten und der indirekten Strahlenwirkung. Bei ersterer wird die applizierte Strahlungsenergie direkt vom zu untersuchenden Objekt (Protein, DNS, Zelle) aufgenommen und entfaltet dort seine Wirkung. Dieser Mechanismus betrifft vor allem das Bestrahlen fester Substanzen.

Bei der indirekten Strahlenwirkung, die vor allem für Lösungen ihre Bedeutung hat, wird die Energie von Molekülen des Lösungsmittels (z.B. Wassermoleküle einer wässrigen Lösung) aufgenommen, die dann in Wechselwirkung mit der Untersuchungssubstanz, z.B. Protein, treten. Den Vorgang dieser Absorption bezeichnet man beim Wasser, dem am häufigsten verwendeten Lösungsmittel, als Wasserradiolyse; die Produkte sind chemisch sehr reaktive Moleküle (hydratisierte Elektronen, H- und OH-Radikale), die sogenannten Primärradikale. Da der direkten Strahlenwirkung in verdünnten Lösungen auf Grund der Trefferwahrscheinlichkeit nur eine untergeordnete Rolle zukommt, lassen sich Veränderungen an der zu untersuchenden Substanz auf den überwiegenden Einfluß dieser Primärradikale zurückführen.

Geht man von dieser Erkenntnis aus, so interessiert im nächsten Schritt die Frage, ob es spezifische Wirkungen gibt, die einem der Primärradikale zugeordnet werden können. Setzt man die Untersuchungslösung einer Stickstoffgas-Atmosphäre aus, so verhindert man eine Reaktion der Radikale mit dem Luftsauerstoff und kann damit die gemeinsame Wirkung mit Proteinmolekülen beobachten. Ersetzt man den Stickstoff durch Distickstoffmonoxid (N_2O), gelingt die Entfernung, bzw. Umwandlung der hydratisierten Elektronen und eines Großteils der H-Radikale. Es verbleiben vorwiegend die OH-Radikale für weitere Reaktionen. Kombiniert

man nun dieses Gas mit einem zusätzlichen Scavenger, wie man diese Radikalfänger auch bezeichnet, so sollte es gelingen, auch die OH-Radikale abzufangen und damit entweder einen totalen Schutzeffekt vor den Wirkungen der Primärradikale oder eigenständige Reaktionen der Scavengerradikale hervorzurufen. Als Scavenger, die in der Lage sind, OH-Radikale abzufangen, eignen sich zum Beispiel Äthanol, t-Butanol oder Formiat, das Salz der Ameisensäure.

1.2. Problemstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, einen Beitrag zur Untersuchung der oben aufgeworfenen Probleme zu liefern. Als Versuchssubstanz wurde das Serumalbumin des Rindes (RSA) gewählt, ein Protein, das sich vom Serumalbumin des Menschen nur geringfügig unterscheidet, dem aber als Transporteiweiß im Blut beider Spezies eine enorme Bedeutung zukommt. Untersucht werden soll, welche Rolle OH-Radikale bei Bestrahlung einer wässrigen RSA-Lösung spielen, ferner die Frage, welche Modifikationen des RSA entstehen, wenn diese OH-Radikale mit Formiat bzw. Äthanol als Scavenger abgefangen werden und nur noch diese als Radikal mit dem Protein reagieren können.

Eine wichtige Rolle für den Ladungszustand eines Proteins, und damit die Möglichkeit seiner chemischen Reaktionen, spielt der pH-Wert der Lösung. Anhand eines sauren und eines alkalischen pH-Wertes für oben genannte Untersuchungen soll dieser Frage Rechnung getragen werden.

Eine nähere Spezifizierung ablaufender chemischer Reaktionen soll dadurch versucht werden, daß durch

Zugabe von Mercaptoäthanol zu den Bestrahlungsprodukten eine Zerstörung von Disulfidbrücken im Protein möglich ist (= Reduktion). Damit können, im Vergleich zu Proben ohne Reduktion, Aussagen über das Bildungsverhalten dieser Schwefelbrücken gefunden werden.

Die Auftrennung der Bestrahlungsprodukte soll mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) erfolgen, einer Methode, die es erlaubt, Proteinmengen im Mikrogrammbereich nur auf Grund ihrer Molekülgröße, bzw. ihres Molekulargewichts zu trennen. Die Entscheidung für eine 10^{-3} M Phosphatpufferlösung für das Protein fiel wegen der geringen Reaktion des Phosphats mit den Radikalen und wegen der guten Einstellbarkeit des pH-Werts.

Wie schon in anderen Arbeiten (S5) (W1) erfolgreich eingesetzt, soll auch hier die rechnergestützte Auswertung der Meßergebnisse helfen, eine Abhängigkeit zwischen Proteinmenge und Dosis zu finden. Die Schwierigkeit der direkten Messung der Proteinmenge nach der Elektrophorese umgeht man, indem man den linearen Zusammenhang mit der Absorptionsfläche bei der photometrischen Auswertung für Rückschlüsse nutzt.

Im folgenden soll zunächst der methodische Teil der Arbeit näher erläutert werden, um im Anschluß an die Darstellung der Ergebnisse einen Versuch ihrer Interpretation zu unternehmen.

2. Experimenteller Teil

2.1. Geräte und Materialien

2.1.1. Geräte

Zur Durchführung der Versuche wurden folgende Geräte verwendet:

- Röntgenröhre Stabilipan 300; Siemens, Erlangen
- Kühlaggregat Ultra-Kryomat TK 30; Wobser, Lauda
- pdp 11; Digital Equipment Corporation, Galway, Irland
- Benson 111; Benson, Frankreich
- Spektralphotometer PMQ II; Zeiss, Oberkochen
- Disc-Ansatz ZK 4 zum Spektralphotometer PMQ II; Zeiss, Oberkochen
- TE-Wandler; Zeiss, Oberkochen
- Servogor-Kompensationsschreiber RE 541; Metrawatt, Nürnberg
- Analog-Digital-Wandler Multilog 801; Optilab, Vällingby, Schweden
- Printer-Driver 833; Optilab, Vällingby, Schweden
- Electronic Timer 825; Optilab, Vällingby, Schweden
- Teleprint 390; Teleprint, Eschborn
- VoKam-Netzgerät SAE 2761; Shandon, Frankfurt/Main
- Electrophoresis Power Supply EPS 500/400; Pharmacia, Uppsala, Schweden
- Elektrophorese-Apparatur GE-4; Pharmacia, Uppsala, Schweden
- Schüttelwasserbad, Typ 1083; Gesellschaft für Labortechnik, Hannover
- Probenrüttler; Heidolph
- Probenrüttler; Eppendorf, Hamburg
- Brutschrank FTB 420; Heraeus, Hanau

- Elektrische Magnetrührgeräte IKA-Combimag;
Janke u. Kunkel, Staufen
- Tischrechner 9100 A; Hewlett Packard, Loveland,
Colorado, USA
- Digital pH-Meter 3500; Beckman, Fullerton,
California, USA
- Analysenwaage B6, Präzisionswaagen P 120 und
P 1200, sowie AC 100; Mettler, Zürich
- Dampfsterilisator Vapoklav; Sterico, Dietikon,
Schweiz
- Precibor-Elektrophorese-Röhrchen (120 mm lang,
Durchmesser innen 5 mm, außen 7 mm);
Shandon, Frankfurt/Main
- Elektrophorese-Gelröhrchen (140 mm lang, Durch-
messer innen 5 mm, außen 7 mm);
Pharmacia, Uppsala, Schweden
- Gelröhrchenständer GRC-16; Pharmacia, Uppsala,
Schweden
- Finnpietten versch. Größen; Finnpiette Ky,
Helsinki
- Reaktionsgefäße 1,5 ml; Eppendorf, Hamburg
- Bestrahlungstöpfchen aus Quarzglas mit Plexi-
glasmantel, nach Plan angefertigt von Herrn
Lehmeier, Institut für Radiologie der Universi-
tät Erlangen-Nürnberg
- Wasseraufbereitungsanlage der Firma Karl Klein
und Sohn (KKS), Mannheim

2.1.2. Materialien

Folgende Materialien wurden verwendet:

- Acrylamid, 2xkrist.; Serva, Heidelberg
- Methylenbisacrylamid, 2xkrist., reinst; Serva,
Heidelberg

- Trihydroxymethylaminomethan; Merck, Darmstadt
- Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4), zur Analyse; Merck, Darmstadt
- Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4), zur Analyse; Merck, Darmstadt
- N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin (TEMED), reinst; Serva, Heidelberg
- Ammoniumpersulfat, p.A.; Serva, Heidelberg
- Glycin, p.A.; Merck, Darmstadt
- Dodecylsulfat, Na-Salz, (SDS), krist., reinst.; Serva, Heidelberg
- Natriumformiat, p.A.; Merck, Darmstadt
- Äthanol, p.A.; Merck, Darmstadt
- Methanol, p.A.; Merck, Darmstadt
- Eisessig, p.A.; Merck, Darmstadt
- Coomassie Brilliant Blue R 250, rein; Serva, Heidelberg
- Bromphenolblau, Na-Salz, reinst; Serva, Heidelberg
- (1) Albumin aus Rinderserum (RSA), lyophilisiert; Boehringer, Mannheim
- (2) Gamma-Globulin aus Rinderserum, lyophilisiert; Serva, Heidelberg
- (3) Katalase aus Rinderleber; Boehringer, Mannheim
- (4) Ovalbumin, 1xkrist., rein; Serva, Heidelberg
- (5) Chymotrypsinogen A aus Rinderpankreas; Serva, Heidelberg
- (6) Myoglobin vom Pferd, reinst.; Serva, Heidelberg
- (7) Phosphorylase A aus Kaninchen; Boehringer, Mannheim
- (8) Beta-Galactosidase aus E. coli; Boehringer, Mannheim

Die mit (1) - (8) bezeichneten Proteine wurden für die Erstellung der Eichgeraden verwendet.

2.2. Methoden

2.2.1. Proteinlösung

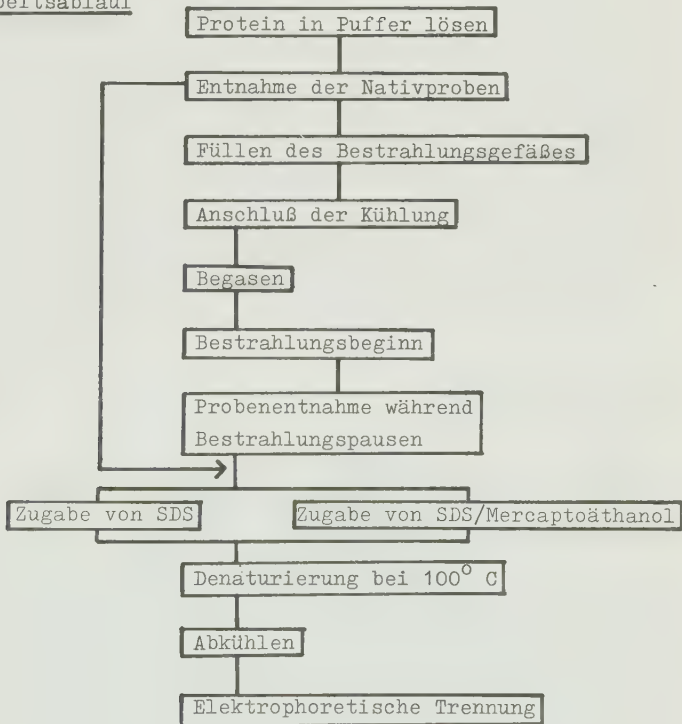
Bei allen Versuchen wurde Rinderserumalbumin in einer Konzentration von 1 mg/ml, entsprechend einer molaren Konzentration von $1,5 \times 10^{-5}$ Mol/l, bestrahlt. Verwendung fand dazu das in der Materialienliste aufgeführte Rinderserumalbumin, von dem 11 mg abgewogen und in 11 ml Phosphat-Puffer (10^{-3} M) gelöst wurden. Abhängig von den verschiedenen Versuchsbedingungen geschah die Pufferzubereitung folgendermaßen:

- 1) Bei Lösungen, die ohne Zusatz von Formiat oder Äthanol angesetzt wurden, ergaben sich die pH-Werte 6.3 / 7.0 / 8.2 durch Mischen der Na_2HPO_4 - und der NaH_2PO_4 -Pufferlösung, jeweils 10^{-3} M, unter gleichzeitiger pH-Meter-Kontrolle.
- 2) Bei Lösungen mit Zusatz von Formiat mußte der Na_2HPO_4 -Puffer vor Versuchsbeginn jeweils frisch hergestellt werden, da dieser bei mehrtägigem Stehen im pH-Wert absank. Die frische Pufferlösung hatte in der Regel einen pH-Wert von 8.9 - 9.0. Davon wurden 20 ml mit 136 mg Natriumformiat (NaCOOH) gemischt, was einer Formiat-Konzentration von 10^{-1} Mol/l entspricht; der resultierende pH-Wert vor Lösen des Rinderserumalbumins betrug damit 8.2. Für die Versuchsreihe mit pH 7.0 war es nötig, wiederum durch Mischen der zwei Phosphatpuffer, einen pH-Wert von 7.3 einzustellen, der nach Zusatz von Formiat auf 7.0 absank. Für die Versuchsreihe mit pH 6.3 betrug der pH-Wert der Pufferlösung vor Formiatzugabe 6.1.
- 3) Für die Versuche mit Äthanol waren keine Vorbedingungen bezüglich des pH-Werts nötig. Dieser wurde,

wie unter 1) beschrieben, eingestellt. Jeweils 20 ml der Pufferlösung wurden mit 116 μ l Äthanol gemischt, um die 0.1 molare Konzentration an Äthanol zu erreichen.

Das weitere Vorgehen wird aus nachfolgender Ablaufskizze deutlich:

Arbeitsablauf



Die 11 ml Proteinlösung verteilten sich folgendermaßen:

10 ml wurden in das Quarztöpfchen des Bestrahlungsgefäßes pipettiert, das später genauer beschrieben wird, und jeweils 50 μ l in vier kleine Reaktionsgefäße, die damit die Nativproben bildeten; zwei davon für den Versuchsabschnitt ohne Reduktion und zwei für den mit Reduktion.

Die Wahl von 11 ml Proteinlösung wurde, wie jetzt ersichtlich, deshalb getroffen, um zum einen die 10 ml für die Bestrahlung leichter pipettieren zu können, und um zum anderen die Nativproben nicht von vorneherein den 10 ml Bestrahlungslösung entnehmen zu müssen. Es wurde bei diesem Vorgehen von der Annahme ausgegangen, daß die Nativproben keine Modifikationen erfahren gegenüber Nativproben, die zusätzlich noch der Begasung unterzogen werden.

2.2.2. Bestrahlung

2.2.2.1. Versuchsanordnung

Für die Bestrahlung kam das, in anderen Arbeiten (H5) schon genauer beschriebene Bestrahlungsgefäß (siehe Abbildung 1) zur Anwendung. Das Kernstück bildet ein Quarztöpfchen, in das die oben erwähnten 10 ml Proteinlösung pipettiert wurden. Der wasserdurchströmte Kühlmantel erlaubte es, die Lösung während des Begasens und der Bestrahlung mit Hilfe eines Kryostaten konstant auf 4° C abzukühlen. Die Schichtdicke der Flüssigkeit im Quarztöpfchen betrug 10 mm. Nach oben erfolgte ein Abschluß durch eine 0.03 mm starke Hostaphanfolie.

Zwei Öffnungen oberhalb des Lösungsniveaus ermöglichen die Gaseinleitung (N_2O) und die Probenentnahme. Nach jeder Entnahme wurde die Probenentnahmeöffnung wieder mit Parafilm verschlossen, um einen ungewollten Luft- und damit Sauerstoffzutritt, trotz des herrschenden Gasüberdrucks im Quarztöpfchen, zu verhindern.

Das N_2O -Gas durchströmte vor dem Eintritt in das Bestrahlungsgefäß eine Pyrogallol-Lösung. Die Begasung der Lösung wurde zwei Stunden vor der eigentlichen Bestrahlung begonnen und während dieser fortgesetzt. Für die Versuche, in denen Äthanol in der Proteinlösung vorhanden war, wurde die Kühlung schon 15 Minuten vor dem Einleiten des Gases in Betrieb gesetzt, um unnötige Äthanolverluste durch Verdunstung zu verhindern. Ein langsam drehendes Magnetrührstäbchen sorgte während des Begasens und der Bestrahlung für eine gleichmäßige Durchmischung der Lösung.

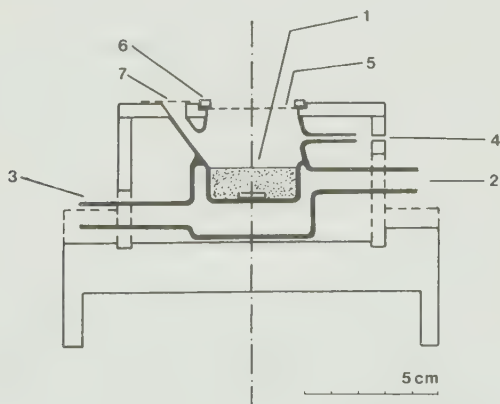


Abb. 1: Schnitt durch das Bestrahlungsgefäß
1=Quarztöpfchen mit Probe und Rührer
2=Kühlmittelabfluß, 3=Kühlmittelzufluß
4=Gaszuleitung, 5=Hostaphanfolie, 6=Klemmring
7=Öffnung für Probenentnahme

2.2.2.2. Durchführung

Die Bestrahlung wurde mit der Röntgentherapie-
röhre Stabilipan 300 der Firma Siemens durch-
geführt. Der Fokus der Röhre wurde dazu über das
Bestrahlungsgefäß gefahren; der Abstand Röhre -
Quarztöpfchen betrug 2,5 cm und war bei allen Ver-
suchen gleich groß. Die Bestrahlungsbedingungen
waren 200 kV Röhrenspannung bei 20 mA Röhrenstrom,
die Steuerung der Zeit und damit der Dosis erfolgte
über eine eingebaute Schaltuhr. Die Eigenfilterung
der Röhre entsprach 2mm Aluminium. Die Dosislei-
stung, gemessen mit der chemischen Methode nach
Fricke ¹⁾, betrug 29.4 Gy/min, bzw. 1760 Gy/h.
Die Probenentnahme erfolgte in den vorher im Pro-
tokollblatt festgelegten Zeitabständen. Die Ent-
nahmemengen betrugen, je nach Weiterbearbeitungs-
absicht, zwischen 50 ul und 150 ul; sie wurden in
die dafür vorgesehenen und beschrifteten Reaktions-
gefäße pipettiert. Die Proben überschritten gering-
fügig die später benötigten Mengen, da ein genaues
Pipettieren wegen der Enge des Entnahmekanals nicht
möglich war, und um Volumenverlusten durch austre-
tendes Gas bei Erwärmung auf Zimmertemperatur vor-
zubeugen.

1) Die Bestimmung der Dosisleistung führte dankens-
werterweise Frau A. Friedrich durch

2.2.2.3. Weiterverarbeitung

Die Zeit vom Bestrahlungsende bis zur Weiterverarbeitung der Proben betrug ca. 15 - 30 Minuten. Sie reichte aus, um die Reaktionsgefäße mit der Lösung auf Zimmertemperatur zu erwärmen. Überschüssiges gelöstes Gas wurde mit Hilfe eines Probenrüttlers aus den bestrahlten Lösungen entfernt. Zur Weiterverarbeitung kamen jetzt auch die vier Reaktionsgefäße mit den Nativproben, die während der Bestrahlung bei Kühlschranktemperatur aufbewahrt wurden. Eine fortlaufende Nummerierung jedes Reaktionsgefäßes, die im Protokollblatt für jeden Versuch und später auf jedem Gelröhrchen vermerkt wurde, verhinderte ein Verwechseln der Proben und damit der Meßergebnisse.

Das weitere Vorgehen orientierte sich an den von Weber/Osborn (W2) gegebenen Hinweisen. Aus den Reaktionsgefäßen mit der bestrahlten Lösung wurden 50 ul (45 ul) in ein weiteres Reaktionsgefäß abpipettiert und mit 5 ul (75 ul) einer 11 % - (1.6 %) - SDS-Lösung für die Versuchsreihe ohne Reduktion versetzt. Die 11 %, bzw. 1.6 %, SDS-Lösung (1.1 g SDS in 10 ml PO_4 -Puffer 10^{-3} M) stand als Stammlösung zur Verfügung, während die Lösung für die Versuchsreihe mit Reduktion mit einem Gehalt an 11 % (1.6 %) SDS und 11 % (1.6 %) Mercaptoäthanol vor jedem Versuch frisch zubereitet wurde, (1.1 g SDS in 8.9 ml PO_4 -Puffer + $^{11}/100$ Volumenteile Mercaptoäthanol, bzw. 160 mg SDS in 9.84 ml PO_4 -Puffer + $^{16}/1000$ Volumenteile Mercaptoäthanol).

Die oben in Klammern angegebenen Werte kennzeichnen die Mengen- bzw. Konzentrationsverhältnisse nach einer späteren Änderung der Versuchsbedingungen.

Diese Änderung erfolgte mit dem Ziel, eine höhere Auftragsmenge bei der Elektrophorese zu erzielen und damit vorhandene, unvermeidbare Pipettierfehler zu verringern. (s.a. "Elektrophorese").

Um eine gleichmäßige Durchmischung der Proben zu erreichen, wurden diese nochmals fünf Minuten mit dem Probenrüttler behandelt. Anschließend erfolgte eine fünfminütige Inkubation im Brutschrank bei 100° C. Folgte nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur keine unmittelbare elektrophoretische Trennung, so wurden die Proben bei 4° C im Kühlschrank für längstens vier Tage aufbewahrt.

2.2.3. Gele

Die Herstellung der Gele erfolgte mit geringen Modifikationen nach der Methode, wie sie von Weber und Osborn (W2) angegeben wurde. Die Gelröhrchen wurden dazu an einer Öffnung mit Parafilm verschlossen und im passenden Ständer senkrecht fixiert. Für die kleinere Elektrophorese-Apparatur wurden in der Regel zehn, für die später verwendete, größere Apparatur achtzehn Gele gleichzeitig hergestellt, so daß immer ein bis zwei Gele als Reserve für solche Röhrchen vorhanden waren, in denen sich Luftblasen bildeten, oder die aus anderen Gründen nicht für die Elektrophorese geeignet waren.

Die Reagenzien wurden in eine Saugflasche pipettiert, die sich druckmäßig für einen Anschluß an eine Wasserstrahlpumpe eignete. Bei allen Versuchen betrug die Gelkonzentration 7.5 %. Für ca. zehn Gele wurden

dazu folgende Reagenzien pipettiert:

10.1 ml Acrylamid A

11.8 ml H₂O

7.5 ml Unterer Gelpuffer

300 ul SDS (10 %)

Die Zubereitung und Konzentration der Reagenzien sind der oben genannten Anleitung von Weber und Osborn zu entnehmen. Nach dem Einpipettieren wurde die Lösung zehn Minuten durch Anschluß an eine Wasserstrahlpumpe entgast. Inzwischen konnte Ammoniumpersulfat abgewogen und gelöst werden, und zwar abweichend von der, von Weber/Osborn gegebenen Vorschrift, nur in einer Konzentration von 30 mg/ml Wasser. Diese Lösung wurde immer frisch zubereitet und in einer Menge von 300 ul zusammen mit 10 ul TEMED als Polymerisationskatalysator der entgasten Gellösung zugesetzt. Nach erneutem Mischen der Reagenzien mit einem Magnetrührer begann das Füllen der Gelröhrchen. Die Pipettiermenge wurde mit 2 x 850 ul so gewählt, daß die endgültige Gellänge den Abmessungen der Meßküvette entsprach. 100 ul Isobutanol, vorsichtig zugegeben, bildeten einen vorläufigen Abschluß während des 1-2 stündigen Polymerisierungsvorgangs im Gelröhrchen. Die Aufbewahrung der Gele erfolgte bei Zimmertemperatur, während Acrylamid, TEMED und Ammoniumpersulfat (APS) im Kühlschrank verwahrt wurden.

Die Zubereitung des oberen Gels (=Sammelgel) erfolgte wiederum nach Weber/Osborn, lediglich die APS-Konzentration war mit 30 mg/ml geringer. Im Einzelnen lief folgende Arbeitsreihenfolge ab:

1.35 ml Acrylamid A

6 ml H₂O

2.5 ml Oberer Gelpuffer

100 ul SDS (10 %)

- 10 min entgasen -

100 ul APS (30 mg/ml)

10 ul TEMED

Bevor diese Lösung dem unteren Gel überschichtet wurde, erfolgte ein mehrmaliges Spülen des noch freien Gelröhrchenabschnitts mit destilliertem Wasser, um den Isobutanol zu entfernen.

Die erforderliche Gellänge des Sammelgels erreichte man durch Einpipettieren von 400 ul der Gellösung. Bis zum Abschluß der Polymerisierung nach etwa 30 Minuten wurde, wie oben beschrieben, mit 100 ul Isobutanol überschichtet. Nach abschließender Spülung zur Entfernung des Alkohols waren die Gele für die Elektrophorese verwendbar. Erfolgte diese nicht mehr am gleichen Tage, so war es möglich, die Gele durch Auffüllen der Röhrchen mit destilliertem Wasser und Verschuß mit Alufolie bis zu drei Tagen bei Raumtemperatur aufzubewahren, ohne daß ein Qualitätsverlust bei späteren Arbeitsgängen bemerkbar war.

2.2.4. Elektrophorese

Zu Beginn der Versuche erfolgte die elektrophoretisch Trennung der Gele mit dem Gerät der Firma Shandon, mit dem es möglich war, bis zu 8 Gele gleichzeitig zu trennen. Ein späterer Wechsel auf die Apparatur der Firma Pharmacia erlaubte die gleichzeitige Trennung von 16 Gelen. Da sich die Gelröhrchen für beide Geräte nur in der Länge, nicht aber

in ihrem Innendurchmesser von 5 mm unterschieden, war der Wechsel, in Bezug auf den vorangehenden Arbeitsablauf und die Wiederholbarkeit früherer Meßergebnisse, problemlos.

Die Gelröhrchen wurden, nachdem der Parafilm an einem Ende und das überschichtete Wasser im restlichen Gelröhrchen entfernt war, in die Gummiringe des oberen Pufferreservoirs eingesetzt, die zum Halten der Röhrchen und Abdichten des Reservoirs dienten. Beim Eintauchen der Gelröhrchen in das untere Pufferreservoir wurde darauf geachtet, daß keine Luftblasen am unteren Ende der Röhrchen hängenblieben und damit eventuell den Stromfluß behinderten. Durch vorsichtiges Antippen der Röhrchen ließen sich vorhandene Luftblasen leicht entfernen.

Die Auftragung der Proben erfolgte, nachdem diese aus dem Kühlschrank entnommen und auf Zimmertemperatur gebracht waren. Die Auftragsmenge auf das Sammelgel betrug 16.5 μ l (40 μ l). 5 μ l Bromphenolblau (0.05 % in 10^{-2} M Phosphatpuffer, pH 7.0) dienten während der Trennung als optische Kontrollmarke für die Front. Für Versuche mit Reduktion erfolgte eine Zugabe von 5 μ l Mercaptoäthanol. Eine Spatelspitze Sephadex G 200 bildete den Abschluß der Probenauftragung; der Rest des Gelröhrchens wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette vorsichtig mit Elektrodenpuffer aufgefüllt. Wie oben schon erwähnt, betrug nach einer geringfügigen Änderung der Versuchsbedingungen die Auftragsmenge 40 μ l. Damit wurde versucht, bei gleichbleibender Proteinkonzentration von 15 μ g, aber einer fast zweieinhalbfach größeren Auftragsmenge, den Pipettierfehler zu verringern und später resultierende Streuungen bei der Flächenauswertung zu verkleinern.

Als Elektrodenpuffer diente ein Tris-Glycin-Puffer (0.05 M Tris, 0.373 M Glycin, 0.1 % SDS; ca. pH 8.3). Bei der Shandon-Apparatur betrug die Füllmenge jeweils ca. 250 ml für das obere und das untere Pufferreservoir. Sie wurde für jeden Versuch erneuert. Bei der Pharmacia-Apparatur war das untere Pufferreservoir größer (ca. 1 Liter). Diese Pufferlösung wurde erst nach 4-5 elektrophoretischen Trennungen (= ca. 4 Wochen), bei Auftreten sichtbarer Verschmutzungen schon früher, erneuert. Das obere Pufferreservoir erhielt bei jeder Trennung eine neue Füllung.

Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei konstanter Stromstärke. Diese betrug anfangs 0.5 mA pro Gel und wurde viertelstündlich um 0.5 mA auf den endgültigen Wert von 2.5 mA pro Gel erhöht. Die Trennung wurde beendet, wenn die Farbfront 5 - 10 mm vom Unterrand des Gelröhrchens entfernt war.

Die Entnahme der Gele aus den Gelröhrchen erfolgte von der Öffnung des Sammelgels her durch vorsichtiges Herausdrücken mit einem Plexiglasstab, dessen Durchmesser dem Innendurchmesser der Quarzröhrchen entsprach. Mit einer Spritzenkanüle wurde eine Stichmarkierung im Gel etwa 2 - 3 mm vor der Front-Farbbande angebracht, um diese für die spätere photometrische Auswertung kenntlich zu machen. Die Markierung vor der Farbbande wurde deshalb gewählt, um keine Überlagerung mit eventuell vorhandenen Proteinpeaks in der Front zu bekommen. Die Gele wurden für den Färbeprozess unmittelbar in Reagenzgläser übergeführt. Jede Berührung der Gele mit den Fingern mußte dabei vermieden werden, um keine Verunreinigung durch Fremdeiweiß zu verursachen. Das für den weiteren Arbeitsgang nutzlose Sammelgel wurde beim Herausdrücken der Gele in aller Regel derart zerstört, daß

eine weitere Abtrennung vom eigentlichen Trenngel nicht mehr erforderlich war.

2.2.5. Färben

Der Färbvorgang erfolgte ausnahmslos unter Verwendung des Proteinfarbstoffs Coomassie Blue R 250 in einer Konzentration von 0.1 % (1g Coomassie Blue R 250 + 454 ml Methanol + 92 ml Eisessig mit H₂O auf einen Liter aufgefüllt und filtriert). Pro Gel wurden 15 ml Farblösung verwendet, die mit einer Dispensette genau dosiert werden konnten. Die Färbedauer betrug jedesmal 18 Stunden bei Raumtemperatur. Um Flüssigkeitsverlusten durch Verdunsten vorzubeugen, wurden die Reagenzgläser während des Färbe- und Entfärbvorgangs mit Aluminiumkappen verschlossen.

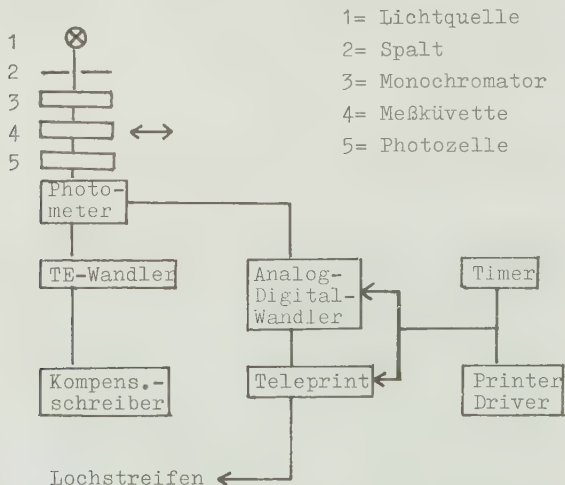
2.2.6. Entfärben

Dem Färbvorgang folgte unmittelbar anschließend der Entfärbvorgang. Vor dem Einfüllen von wiederum 15 ml Entfärbelösung (50 ml Methanol + 75 ml Eisessig auf einen Liter Wasser aufgefüllt), wurden die Gele einmal mit destilliertem Wasser gespült, um überschüssige Farbreste zu entfernen. Während des Entfärbens wurden die Reagenzgläser mit den Gelen im Schüttelwasserbad bei 35°- 40° C bewegt. Der gesamte Entfärbvorgang dauerte ca. 50 Stunden. Die Entfärbelösung wurde zweimal gewechselt, und zwar nach

6 und nach 30 Stunden. Nach der endgültigen Entnahme aus dem Schüttelwasserbad wurden die Gele zur Vorbereitung der photometrischen Messung nochmals mit destilliertem Wasser gespült und dort aufbewahrt, einmal, um keine Extinktionsänderung durch Reste der Entfärbelösung zu bekommen, zum anderen, um längere Entfärbezeiten für die letzten Gele bei der photometrischen Auswertung zu verhindern (ca. 8 Stunden Zeitdifferenz zwischen Messung des ersten und des letzten Gels).

2.2.7. Photometrische Auswertung

Das Prinzip des photometrischen Auswerteverfahrens soll anhand folgender Skizze beschrieben werden:



Die Auswertung erfolgte bei einer Wellenlänge von 500 nm. Die Spaltbreite betrug einheitlich 0.02 mm, die Vorschubgeschwindigkeit für den Geltransport 10 mm/min. Die Irisblende zur Regelung der Spalthöhe blieb voll geöffnet. Ein Transmissions/Extinktions-(TE)-Wandler ermöglichte eine gleichzeitige graphische Darstellung der Kurve mit dem Kompensationsschreiber. Dessen Vorschubgeschwindigkeit betrug 30 mm/min, er dehnte damit die gewonnene Kurve auf das Dreifache. Ein zusätzlich an das Photometer angeschlossener Analog-Digital-Wandler gab, von einem Elektronik-Timer im 3-Sekunden-Rhythmus gesteuert, die digitalen Extinktionswerte an den Teleprint weiter, der diese auf einem Papierstreifen und einem 8-Kanal-Lochstreifen für die spätere Rechnerauswertung ausgab. Der relativ langsame 3-Sekunden-Rhythmus war technisch bedingt, er erlaubte es aber trotzdem, pro Millimeter Gel zwei Meßwerte zu erfassen. Für einen Geldurchlauf waren ca. 220 Meßwerte nötig, von denen etwa 160 auf den Abschnitt zwischen Front und Gelanfang (= Punkt, an dem das Protein aufgetragen wurde) entfielen. Die Nullinieneinstellung am Photometer erfolgte so, daß keine negativen Extinktionswerte im Gel gemessen wurden, da diese vom Analog-Digital-Wandler nicht erfaßt werden konnten und als nichtnumerisches Zeichen (<<<<) ausgegeben wurden. Ein Probelauf des Gels mit der Handkurbel erleichterte diese Einstellung. Um für die spätere Rechnerauswertung einheitliche Bedingungen zu schaffen, erfolgte der Meßbeginn immer vom unteren Gelende her, also von der Front. Die Gele lagen mit ihren Stirnseiten in einem beiderseits 5mm breiten Abstand vom Rand der wassergefüllten, luftblasenfreien Küvette.

Diese Lage erleichterte bei der Interpretation der photometrischen Kurven die Abgrenzung der eigentlichen Gele vom umgebenden Wasser.

2.2.8. Flächenauswertung

2.2.8.1. Eingabe in den Rechner

Die Lochstreifen erhielten vor Beginn der Messung eine Kennung aus 18 Zeichen eingestanzt, die folgende Form besaß:

"Versuch XYZ Gel xy"

Diese Kennung, die auch auf die Kurven des Kompensationsschreibers übertragen wurde, verhinderte spätere Verwechslungen und ermöglichte eine Identifikation der Lochstreifen nach dem Einlesen am Rechner. Dieses Einlesen geschah mit Hilfe des zur Rechnerperipherie gehörenden Lochstreifenlesers. Bevor die Daten gespeichert wurden, erfolgte nochmalige Kontrolle der Versuchskennung und des Datensatzes auf dem Bildschirm. Der Speicherplatz (File) auf der Magnetplatte erhielt einen Filenamen, der sich aus einem Namenskennbuchstaben und der oben beschriebenen Versuchs- und Gelnummer zusammensetzte. So war es möglich, zu einem späteren Zeitpunkt entsprechende Versuchsdaten verwechslungsfrei abzurufen. Die Lochstreifen wurden zur Sicherheit vor einem Datenverlust der Magnetplatte aufbewahrt.

2.2.8.2. Abgrenzung der Peaks

Für die Flächenberechnung war die Abgrenzung der Ausschläge (= Peaks) in der densitometrischen Kurve des Kompensationsschreibers nötig. Sie erfolgte durch Festlegen der Anfangs- und Endadresse der durchnummerierten Extinktionswerte auf dem Teleprint-Kontrollausdruck unter Zuhilfenahme der oben erwähnten Kurve. Als Frontadresse wurde der Peak gewählt, den der Nadelstich vor der Front-Farbbande verursacht hatte. Als Gelanfangs-Adresse diente der Übergang Gel-Wasser, der sich in einigen unregelmäßigen Kurvenausschlägen bemerkbar machte. Die Trennung von ineinander übergehenden Peakgruppen erfolgte durch Angabe der Adresse, die das Extinktionsminimum zwischen zwei Peaks markierte.

2.2.8.3. Flächenberechnung

Die Flächenberechnung erfolgte mit dem von Herrn Schilling (S5) ausgearbeiteten Rechnerprogramm MONTE 3, das neben der Peakfläche gleichzeitig die relative Mobilität und den prozentualen Anteil der errechneten Fläche an einer frei wählbaren Vergleichsfläche berechnete. Das Programm erlaubte entweder eine Berechnung von Einzelpeaks, wobei eine gedachte Grundlinie zwischen Anfangs- und Endadresse des Peaks gezogen wurde, oder von Peakgruppen, wobei die Grundlinie wiederum zwischen Anfangs- und Endadresse der Gruppe gelegt und dazwischenliegende Peaks, auf diese Grundlinie bezogen, berechnet wurden.

Für die Auswertung der Gele wurde einheitlich folgendes Verfahren gewählt: Zunächst wurde eine durchgehende Grundlinie zwischen Front- und Gelanfangsadresse festgelegt, die sich in ihrer Höhenlage möglichst weitgehend dem vorgegebenen Kurvenverlauf anpaßte. Diese Grundlinie wies ein Extinktionsgefälle von 0.030 zwischen Front und Gelanfang auf, entsprechend den Angaben in den Arbeiten von G. Winter (W1) und K. Schilling (S5). Die Berechnung erfolgte, indem das ganze Gel als Peakgruppe ausgewertet wurde und damit ein einheitlicher Bezug zu dieser Grundlinie vorhanden war. Die zwischen den Peaks liegenden Flächen konnten dabei unberücksichtigt bleiben.

2.2.8.4. Korrektur der Daten

Um oben beschriebenes Verfahren sinnvoll einsetzen zu können, mußten die Extinktionswerte für die Front- und Gelanfangsadresse korrigiert werden. Dies konnte entweder manuell, durch Eingabe der Änderung am Bildschirm des Rechners geschehen, oder mit Hilfe des von Freundl/Freundl¹⁾ entwickelten Korrekturprogramms KORRIG 6. Dieses Programm wurde zunächst mit dem Ziel erstellt, gelegentlich vorkommende Negativwerte in Form nichtnumerischer Zeichen (siehe Punkt 2.2.7.), die den Ablauf des

¹⁾ Für die Hilfe bei der Erstellung des Programms danke ich meiner Frau

Programms MONTE 3 stören konnten, selbsttätig durch den Wert Null zu ersetzen. Es wurde später als vielseitiges Korrekturprogramm mit folgenden Eigenschaften weiterentwickelt:

- Korrektur von Front und Gelanfang durch Angabe von Adresse und Wert (für Festlegung der Grundlinie)
- Korrektur eines beliebigen Einzelwertes (bei Kratzern, Luftblasen etc.)
- Korrektur von Abschnitten, für spätere Zeichnungen (siehe dort)
- Korrektur der Höhenlage, für Zeichnungen (siehe dort)
- Selbsttätige Höhenkorrektur auf eine im Programm eingegebene Grundlinie, für Zeichnungen (siehe dort)

Eine detaillierte Programmbeschreibung ist im Anhang zu finden.

2.2.8.5. Zeichnungen

Die graphische Darstellung der Extinktionskurve war, wie oben beschrieben, zunächst mit dem Kompensationsschreiber möglich. Da aber, um auch leicht negative Werte zu erfassen, die Grundlinie am Schreiber auf die Position 0.1 eingestellt wurde, war es nicht möglich, den oberen Anteil hoher Peaks darzustellen. Das Rechnerprogramm PAINT 3 (siehe Schilling (S5)) ermöglichte dagegen eine vollständige Zeichnung der Kurven, indem es für jeden Extinktionswert (theoretisch bis 2.5) die relative Mobilität berechnete und diese in der graphischen

Darstellung gegeneinander auftrug. Die X-Achse wurde so unterteilt, daß die Front mit der relativen Mobilität "1" versehen wurde. Das Programm hatte ferner den Vorteil, daß es die Zeichnung nach Abschluß sämtlicher Korrekturen vornahm. Korrigiert wurden sämtliche Extinktionswerte (ca. 40), die vor der Front lagen (d.h. Wasser, Geleintritt, unteres Gelende); sie waren für Zeichnung und Auswertung ohne Bedeutung und wurden dem Wert für die Front gleichgesetzt, so daß sie in der Zeichnung eine gerade Linie ergaben. Eine entsprechende Änderung am Gelanfang war nicht nötig, da diese Punkte nicht in die Zeichnung aufgenommen wurden. Gelegentlich vorkommende Kratzer im Gel und Luftblasen in der Meßküvette ergaben ebenfalls einen Peak, der in der Regel schon während der Messung als Fehler gekennzeichnet wurde. Die Werte wurden sinngemäß durch interpolierte Extinktionswerte ersetzt. Sämtliche Änderungen konnten mit Hilfe des oben erwähnten Korrekturprogramms KORRIG 6 schnell und problemlos durchgeführt werden. Die Programmstufe "Grundlinien-nivellierung" ermöglichte es darüber hinaus, sämtliche Kurven in den Zeichnungen, von der gleichen Höhe beginnend, darzustellen. Dazu wurde die Differenz gebildet zwischen dem eingegebenen Extinktionswert für die Front und einem im Programm fest integrierten Wert von 0.050, der die Höhenmarke für alle Kurven darstellen sollte. Die errechnete Differenz wurde anschließend von sämtlichen Extinktionswerten zwischen Front und Gelanfang subtrahiert. Die resultierenden Kurven und Peaks erschienen damit in der Höhe vergleichbarer.

2.2.9. Eichkurven

Ziel für die Erstellung der Eichkurven war es, den logarithmischen Zusammenhang zwischen Molekulargewicht und Wanderungsgeschwindigkeit (=RF-Wert) im Gel auszunutzen, um mit diesen Kurven eventuell Aussagen über das Molekulargewichtsverhalten von Peaks bestrahlter Proben zu gewinnen. Verwendet wurden dafür die mit 1 - 8 in der Chemikalienliste bezeichneten Proteine bekannten Molekulargewichts in einer Konzentration von 1mg/ml. Die RF-Werte erhielt man durch Ausmessen des Abstandes der Peakspitzen in der Kurve des Kompensationsschreibers (bei hohen Peaks wurde niedrigere Empfindlichkeit eingestellt) vom Gelanfang. Die Berechnung der RF-Werte ergab sich durch Einsetzen in die Formel

$$RF = \frac{\text{Wanderstrecke Probe}}{\text{Wanderstrecke Front}}$$

Die Berechnung der Regressionsgeraden ($y = ax + b$) und des Korrelationskoeffizienten mit Hilfe eines Tischrechners ermöglichte eine Verbindung der gewonnenen Punkte zur Eichgeraden. Die Eichgeraden wurden für sämtliche Versuchsbedingungen erstellt.

3. Ergebnisse

3.1. Allgemeine Bemerkungen

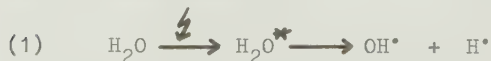
Wie bereits unter Punkt 1.2. (Problemstellung) erwähnt, soll in dieser Arbeit der Frage nachgegangen werden, inwieweit OH-Radikale, bzw. organische Radikale (Formiat, Äthanol), Veränderungen am Serumalbumin des Rindes bewirken, die sich durch elektrophoretische Trennung nachweisen lassen.

Die Ergebnisdarstellung wird so aufgeteilt, daß, nach einer kurzen Erläuterung der Reaktionspartner, zunächst anhand einiger ausgewählter, rechnergezeichneter Elektropherogramme allgemeine Beobachtungen beschrieben werden, und daß anschließend das Flächenverhalten der einzelnen Peaks (Front-, Haupt-, Aggregatpeaks) untersucht wird. Beides geschieht im Vergleich zweier pH-Werte und abhängig davon, ob Versuchsbedingungen mit oder ohne Reduktion vorlagen.

3.2. Bestrahlung von Serumalbumin unter N_2O

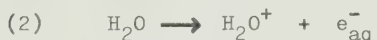
3.2.1. Radikale

Wie aus der Strahlenchemie bekannt ist, entstehen bei der Radiolyse von Wasser Reaktionsprodukte nach folgenden Gleichungen:



Bei diesem Prozeß entsteht unter Strahleneinwirkung ein angeregtes H_2O -Molekül, das in zwei Radikale zerfällt. In einer anderen Reaktion kann ein H_2O -Molekül

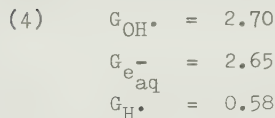
ionisiert werden, wobei ein Elektron entsteht, das sich innerhalb von 10^{-11} Sekunden mit einer Wasserhülle umgibt:



Das in Gleichung (2) entstandene H_2O^+ -Ion kann schließlich noch unter weiterer Abspaltung eines OH-Radikals dissoziieren:



Die G-Werte für die gebildeten Radikale betragen bei pH 7:



Will man die hydratisierten Elektronen eliminieren, so daß nur OH- und H-Radikale mit dem Proteinmolekül reagieren können, so führt man die Bestrahlung unter N_2O -Gas durch. Dabei geschieht die Umwandlung der Elektronen in OH-Radikale nach folgender Gleichung ($k = 8.7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$):



Da bei dieser Reaktion weitere OH-Radikale gebildet werden, nimmt deren Anzahl gegenüber den H-Radikalen weiter zu, so daß diese eine praktisch vernachlässigbare Rolle bei Reaktionen mit dem Serumalbumin-Molekül spielen.

3.2.2. Bestrahlung bei einem pH-Wert von 6.3

Die Bestrahlung von Rinderserumalbumin (1 mg/ml) erfolgte unter den in Punkt 2.2. (Methoden) angegebenen Bedingungen. Die Bestrahlungsdauer betrug eine Stunde, wobei in kurzen Bestrahlungspausen Proben in verschiedenen Zeitabständen entnommen wurden. Die elektrophoretische Auftrennung und die flächenmäßige Auswertung erfolgte nach den beschriebenen Richtlinien.

3.2.2.1. Deskriptive Auswertung der Elektropherogramme

Abbildung 2 zeigt die Elektropherogramme der bestrahlten Rinderserumalbumin-Lösung unter N_2O , bei pH 6.3 und ohne Zusatz eines reduzierenden Reagens. Gegenübergestellt wurden die Kurve der unbestrahlten RSA-Lösung mit denen der fünf Proben, die nach 10, 20, 30, 40 und 60 Minuten Bestrahlungszeit entnommen wurden. Die Angabe der Dosis erfolgt in Gray. Die X-Achse markiert die Wanderungsgeschwindigkeit der Proben (= RF-Wert), während auf der Y-Achse die photometrische Extinktion bei 500 nm Wellenlänge aufgetragen ist.

Es lassen sich drei Peaks, bzw. Peakgruppen unterscheiden: Ein Peak mit einer Wanderungsgeschwindigkeit von ca. 0.95-1.0, im folgenden Frontpeak genannt, ein Peak mit einem RF-Wert von ca. 0.7 (=Hauptpeak) und eine von der Dosis abhängige, wechselnd große Peakgruppe (= Aggregatpeaks) mit RF-Werten kleiner 0.4. Der in der Kurve "Nativ" vorkommende Front-, bzw. Aggregatpeak, ist als Verunreinigung der RSA-Trockensubstanz anzusehen und als solches für

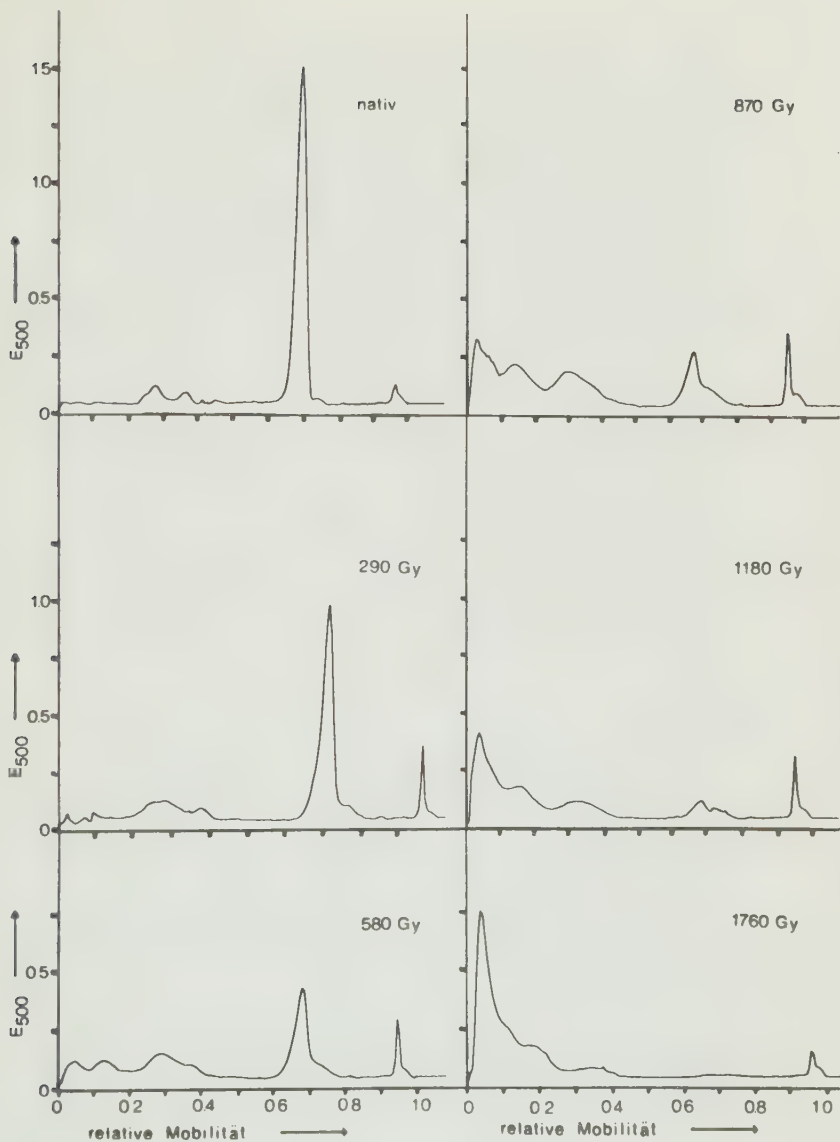


Abb. 2: Elektropherogramme RSA / N₂O / pH 6.3
Versuchsreihe ohne Reduktion

weitere Betrachtungen ohne Bedeutung.

Von primärem Interesse für die Interpretation der Kurven ist das Verhalten des Hauptpeaks. Dieser kennzeichnet die Stelle im Gel, bis zu der die unveränderten RSA-Moleküle bei der Elektrophorese wandern. Es zeigt sich, daß der Hauptpeak mit zunehmender Dosis kleiner und an der Basis breiter wird, wobei er gleichsam eine Schulter in Richtung Front entwickelt (siehe Kurve 580 Gy, 870 Gy, 1160 Gy). Nach einer Stunde Bestrahlung, entsprechend einer Dosis von 1760 Gy, ist der Hauptpeak praktisch nicht mehr nachzuweisen. Dies ist ein Zeichen dafür, daß die Wechselwirkungen der Wasserradiolyseprodukte mit den RSA-Molekülen zu inter- und intramolekularen Veränderungen geführt haben müssen, so daß keine unveränderten RSA-Moleküle mehr vorliegen.

Der Frontpeak gilt als Vertreter von Molekülen mit einem Molekulargewicht bis zu 20000. Er zeigt in Abhängigkeit von der Dosis zunächst eine Zunahme, verkleinert sich aber schließlich wieder auf die Größe, die er in der unbestrahlten Probe zeigt.

Von größerem Interesse ist das Verhalten der sogenannten Aggregatpeaks (RF 0.4 - 0). Sie markieren die Wanderungsposition von Molekülen mit einem Molekulargewicht von ca. 120000 bis über 200000.

Mit steigender Dosis läßt sich dabei die Ausbildung einer charakteristischen Dreiergruppierung verfolgen (siehe 1160 Gy-Kurve). Zur weiteren Vereinfachung der Beschreibung sollen hier folgende Bezeichnungen eingeführt werden:

Aggregatpeak I = Peak mit einem RF-Wert von ca. 0.35
Aggregatpeak II = Peak mit einem RF-Wert von ca. 0.18
Aggregatpeak III = Peak mit einem RF-Wert von ca. 0.05

Diese Bezeichnungen erweisen sich als praktisch, da ähnliche Aggregatgruppierungen bei den anderen Versuchsbedingungen ebenfalls entstanden. Eine detaillierte Beschreibung der Aggregatpeaks soll später anhand der Flächenauswertungen erfolgen. Abbildung 3 zeigt das Verhalten des Serumalbumins unter sonst gleichen Bedingungen, lediglich mit Zusatz von Mercaptoäthanol nach der Bestrahlung zur Reduktion der Disulfidbrücken. Auffällig ist zunächst die geringere Wanderungsstrecke des Hauptpeaks, bedingt durch die Spaltung der S-S-Brücken und die damit verbundene räumliche Vergrößerung des Moleküls. Ferner fällt die oben erwähnte Verbreiterung der Peakbasis und der Höhenverlust bis ca. 870 Gy geringer aus, beides erscheint aber, auch im Hinblick auf die spätere Flächenauswertung, ohne größere Bedeutung zu sein. Nach einer Dosis von 1760 Gy findet sich auch hier ein kaum nachweisbarer Hauptpeak und die charakteristische Dreierstruktur der Aggregatpeaks.

3.2.2.2. Flächen- / Dosisverhalten der Peaks

Mit Berechnung der Peakflächen sollte der Versuch unternommen werden, die gefundenen qualitativen Veränderungen auch quantitativ darzustellen. Dazu wurde die Fläche des Hauptpeaks in der Nativprobe (bzw. der Mittelwert bei mehreren unbestrahlten Proben) als 100 Prozent angenommen und untersucht, wie die Flächen der bestrahlten Proben prozentual von der Nativprobe abweichen. Die Auftragung erfolgte so, daß auf der X-Achse die Dosis in Gray und auf der Y-Achse die Farbfläche in Prozenten zu liegen kam.

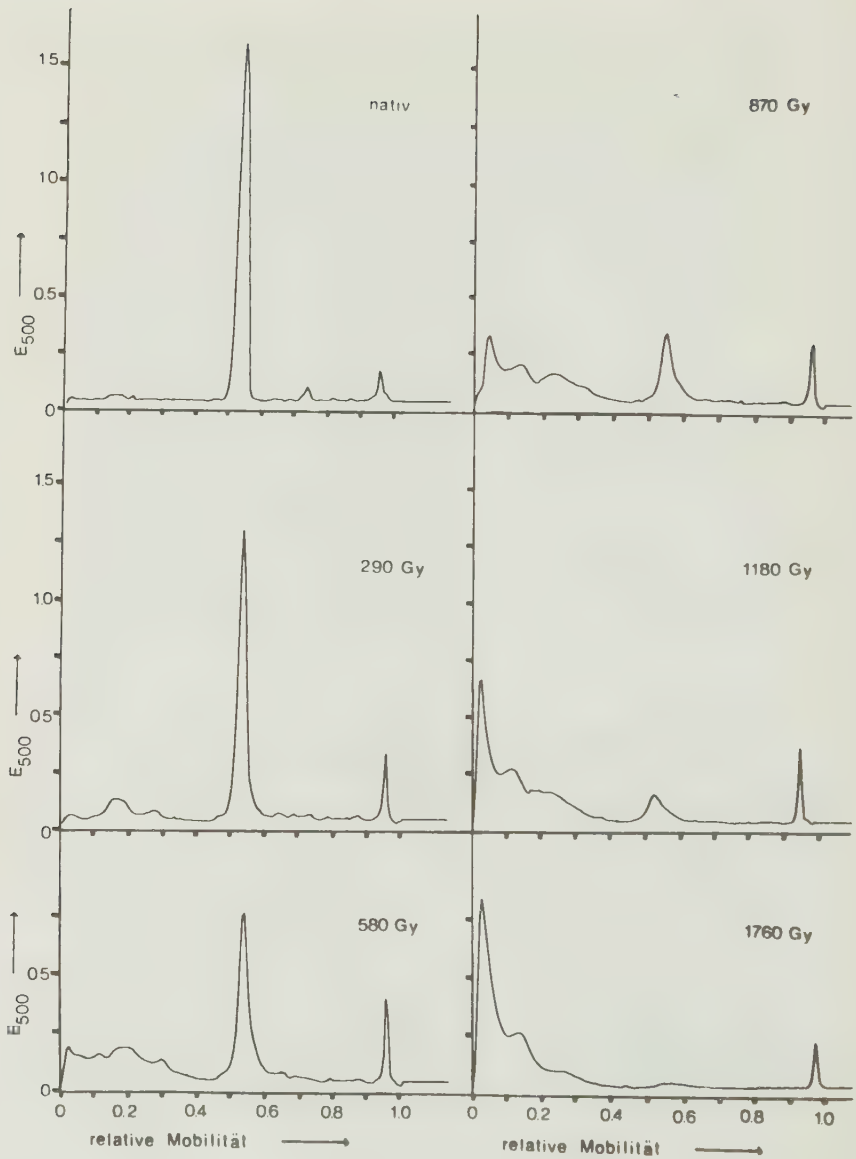


Abb. 3: Elektropherogramme RSA / N_2O / pH 6.3
Versuchsreihe mit Reduktion

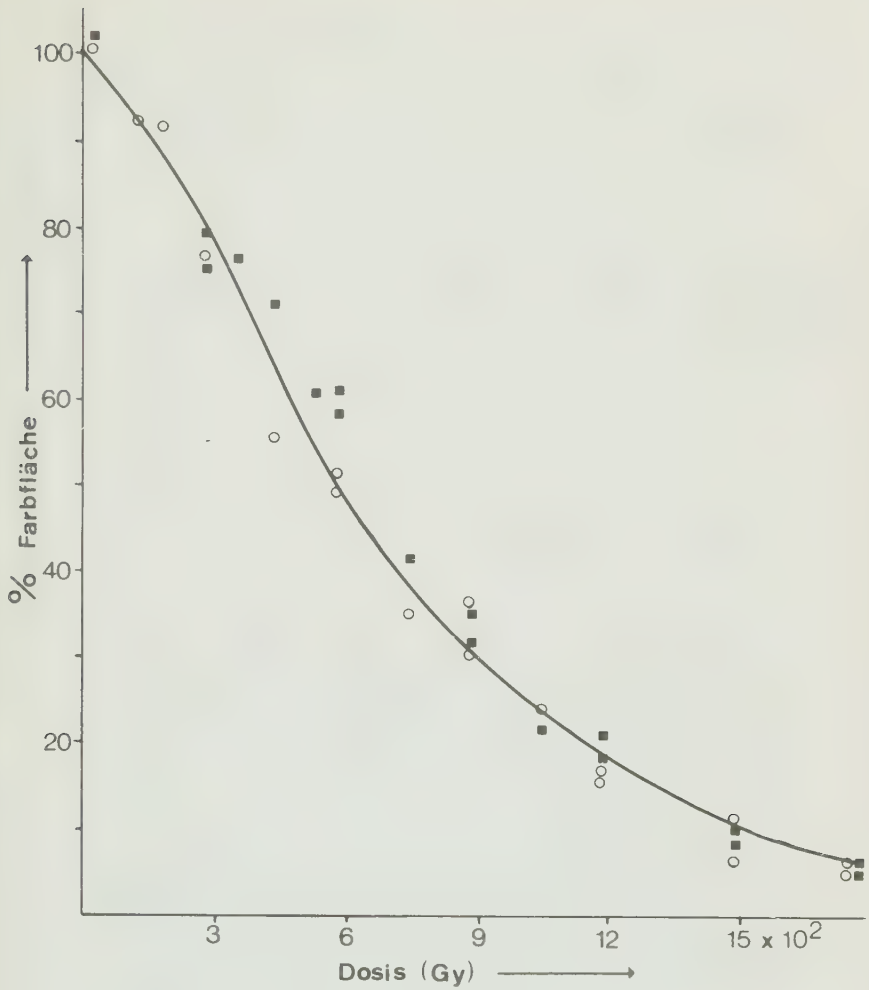


Abb. 4: Flächen-/Dosisverhalten des Hauptpeaks
RSA / N₂O / pH 6.3

- Versuchsreihe ohne Reduktion
- Versuchsreihe mit Reduktion

Abbildung 4 zeigt die Flächenabnahme des Hauptpeaks bei pH 6,3 in Abhängigkeit von der Dosis. Es konnte dabei kein Unterschied zwischen den Versuchsbedingungen mit und ohne Reduktion festgestellt werden. Wie in der qualitativen Beschreibung bereits erwähnt, nimmt die Fläche des Hauptpeaks bis auf etwa 5 % der ursprünglichen Fläche ab. Das bedeutet, daß etwa 95 % der RSA-Moleküle vornehmlich mit den OH-Radi- kalen reagiert haben müssen.

Neben der Frage, welche Aussagen über das Verhalten des Hauptpeaks gemacht werden können, ist es darüber- hinaus wünschenswert zu wissen, ob auch quantitative Aussagen über das Verhalten des Frontpeaks und der, am anderen Ende der Molekulargewichtsskala liegen- den, Aggregatpeaks möglich sind. Die Auswertung dazu geschah prinzipiell wieder nach den gleichen Bedin- gungen wie beim Hauptpeak. Als Vergleichsfläche dien- te die Hauptpeakfläche in der unbestrahlten Probe. Dies geschah unter der Annahme, daß letztlich jede Flächenzunahme im Front-, bzw. Aggregatpeak, mit einer Flächenabnahme im Hauptpeak korreliert. Um die im un- bestrahlten RSA vorhandenen Verunreinigungen bei die- sen Peaks zu eliminieren, wurden deren Flächen von denen bestrahlter Proben subtrahiert, so daß nur der reine Flächenzugewinn bei der Auftragung in der Kurve zur Geltung kam.

Abbildung 5 zeigt das Flächenverhalten des Frontpeaks bei pH 6,3 in Abhängigkeit von der Dosis. Es läßt sich bis zu einer Dosis von 900 Gy eine leichte Zunahme, anschließend aber eine konstante Abnahme feststellen. Mit einem maximalen Anteil von nur 5 % an der Fläche des unbestrahlten Hauptpeaks scheint aber nur ein we- nig bedeutender Reaktionsmechanismus zur Bildung von Molekülbruchstücken dieser Größe zu führen.

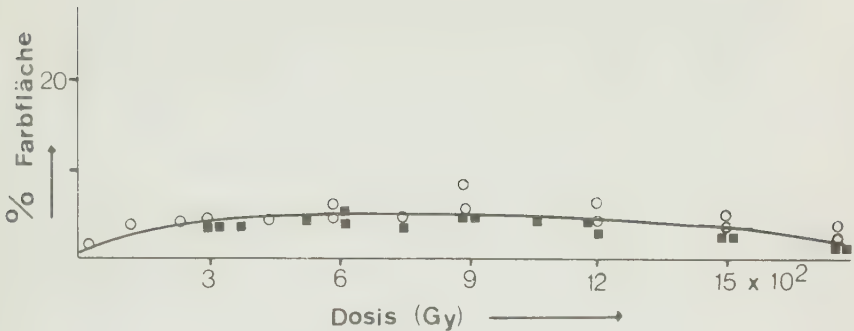


Abb. 5: Flächen-/Dosisverhalten des Frontpeaks
RSA / N₂O / pH 6.3
- ○ - Versuchsreihe ohne Reduktion
- ■ - Versuchsreihe mit Reduktion

Wesentlich interessantere Ergebnisse bringt dagegen die Auswertung der Aggregatpeaks. Abbildung 6 zeigt das entsprechende Verhalten des Aggregatpeaks I. Auffällig ist der sprunghafte Anstieg der Peakfläche nach einer Dosis von ca. 600 Gy, ihr Übergang in eine kurzdauernde Plateauphase und der Abfall der Kurve mit weiter steigender Dosis. Vergleicht man den RF-Wert dieses Aggregatpeaks mit der zugehörigen Eichkurve (Abb. 38), so kann man das Molekulargewicht der hier vorhandenen Proteine etwa zwischen 110000 und 140000 ansetzen. Geht man von einem RSA-Monomer mit einem Molekulargewicht von 68000 aus, so kann man folgern, daß im Aggregatpeak I vornehmlich Proteine mit einem etwa doppelt so großen Molekulargewicht vorhanden sind. Es liegt die Vermutung

nahe, daß es sich dabei um Dimere handelt, also Proteine, die durch Aggregation zweier Monomere über noch näher zu definierende chemische Brücken entstanden sind.

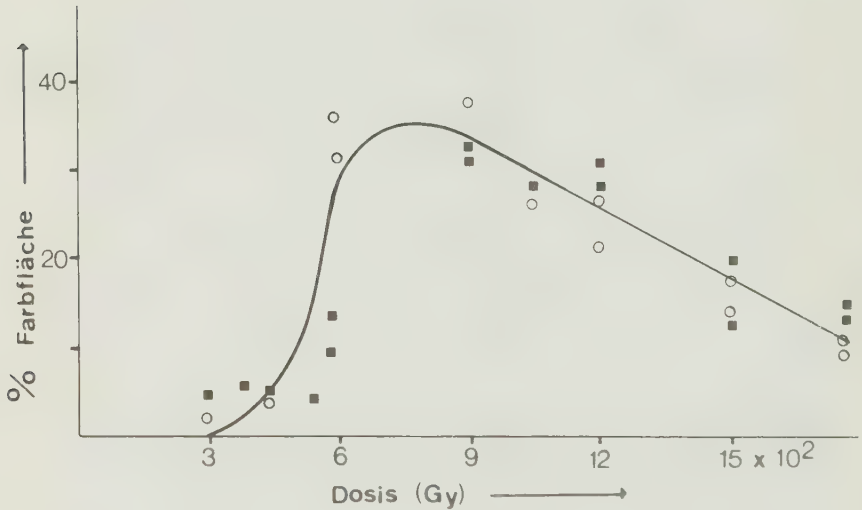


Abb. 6: Flächen-/Dosisverhalten des Aggregatpeaks I
RSA / N₂O / pH 6.3
-○- Versuchsreihe ohne Reduktion
-■- Versuchsreihe mit Reduktion

Abbildung 7 zeigt für den Aggregatpeak II ein dem Aggregatpeak I vergleichbares Verhalten, mit einer nicht so sprunghaften Anstiegsphase und einer nach-

folgenden, flacher verlaufenden Rückbildungsphase. Ein Vergleich mit der Eichkurve zeigt, daß es sich hier um Proteine mit einem Molekulargewicht von etwa 180000 bis 220000 handelt, ein Bereich, der an eine Bildung von Trimeren denken läßt.

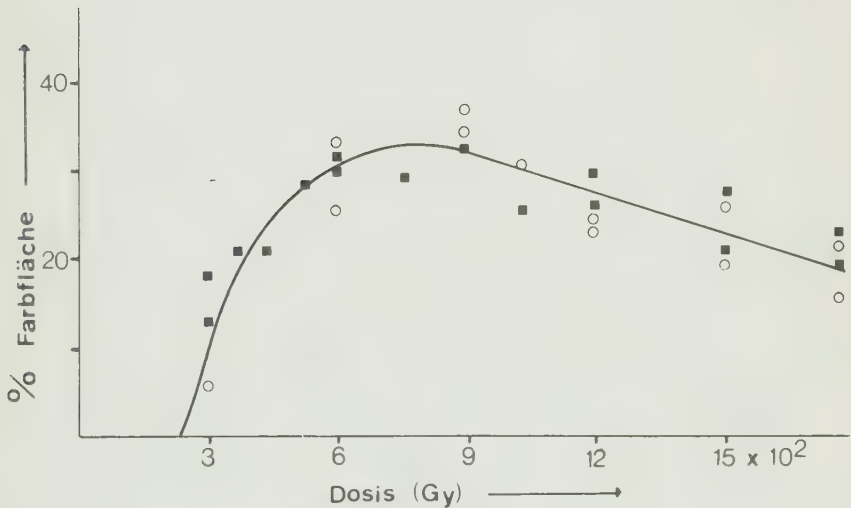


Abb. 7: Flächen-/Dosisverhalten des Aggregatpeaks II
RSA / N₂O / pH 6.3
-○- Versuchsreihe ohne Reduktion
-■- Versuchsreihe mit Reduktion

Völlig anders verhält sich dagegen Aggregatpeak III (Abb. 8). Hier erkennt man etwa ab 600 Gy eine konstante Zunahme der Fläche mit der Dosis bis zu einem

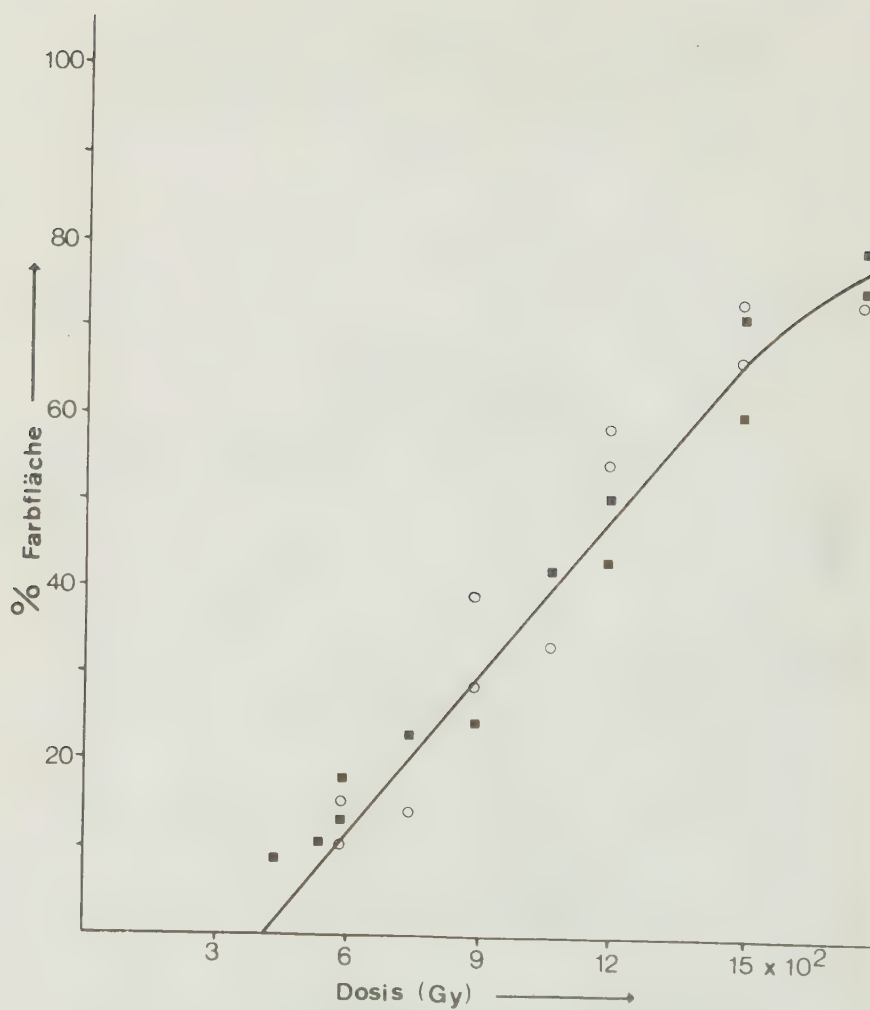


Abb. 8: Flächen-/Dosisverhalten des Aggregatpeaks III
RSA / N₂O / pH 6.3
-○- Versuchsreihe ohne Reduktion
-■- Versuchsreihe mit Reduktion

Wert von 75 - 80 % der Fläche des Nativ-Hauptpeaks. Die hier vorhandenen Proteine liegen mit ihrem Molekulargewicht in einem Bereich, dessen Untergrenze bei etwa 230000 beginnt, dessen obere Grenze aber wegen der hier endenden Trennfähigkeit des Gels nicht näher festgelegt werden kann. Geht man davon aus, daß es sich im Aggregatpeak I und II um Dimere, bzw. Trimere, handelt, so liegt die Annahme nahe, daß im Aggregatpeak III tetramere oder höhermolekulare Verbindungen vorliegen.

Faßt man diese Ergebnisse zusammen, so ergibt sich folgendes Bild. Die Bestrahlung einer wässrigen RSA-Lösung führt über die Reaktion der OH-Radikale zu einer Veränderung der RSA-Moleküle. Sie äußert sich zunächst in einer Verbreiterung der Peakbasis, gleichbedeutend mit dem Vorhandensein von Proteinen, deren Molekulargewicht durch Verlust eines Bruchstückes geringer geworden, oder deren räumliche Struktur durch eine intramolekulare Quervernetzung kleiner geworden ist. Beide Kriterien würden die Ausbildung der kleinen Schulter erklären, wie sie in Abbildung 2 gefunden wurde. Die Ausprägung eines Frontpeaks wäre ein vorläufiger Beweis für die Bruchstücktheorie. Die Abnahme der Frontpeakfläche mit steigender Dosis beruht dann nicht auf einer Änderung im Reaktionsmechanismus, der diese Bruchstücke erzeugt, sondern auf einem zunehmenden Mangel des RSA-Reaktionspartners (vgl. Abb. 4) durch andere Modifikationen. Sie bewirken intermolekulare Quervernetzungen in deren Folge Aggregatpeaks entstehen. Dabei scheint in einem ersten Schritt eine rasche Ausbildung von Dimeren und Trimeren im Vordergrund zu stehen (Abb. 6 u. 7). Sie beginnt ab einer Dosis von 300 - 600 Gy. Im weiteren Verlauf sind diese niedermolekularen Aggregate

ebenfalls von Veränderungen betroffen, die zur Ausbildung höhermolekularer Aggregate führen (s. Abb. 8). Der Abfall der Kurve für den Aggregatpeak I im oberen Dosisbereich wäre demnach eine Folge davon, daß der "Abfluß" in Richtung höhermolekulare Aggregate den "Zufluß" aus Richtung Hauptpeak und eventuell Frontpeak überwiegt. Gleiches gilt für Aggregatpeak II, lediglich fällt seine Abnahme im oberen Dosisbereich geringer aus, was sich durch einen möglichen Zufluß aus dem Aggregatpeak I erklären läßt. Ein Auffangbecken, um bei diesem Bild zu bleiben, für die verschiedenen Modifikationen bildet Aggregatpeak III. Er erhält seinen Zustrom einmal aus dem Hauptpeak über Moleküle, die sich direkt zu hochmolekularen Aggregaten zusammenlagern. Dieser Reaktionsweg dürfte allerdings nur gering ausgeprägt sein, wie aus den Kurven für Aggregatpeak I und II hervorgeht. Vielmehr deutet der steile Anstieg im oberen Dosisbereich darauf hin, daß hochmolekulare Aggregate, die aus niedermolekularen Aggregaten des Aggregatpeaks I und II entstehen, hier zu finden sind.

Für alle Betrachtungen gilt, daß kein, mit diesen Methoden meßbarer, Unterschied zwischen den unreduzierten und den reduzierten Bestrahlungsprodukten besteht. Dies läßt, was die chemische Natur der Bindungen zwischen den Aggregatmolekülen betrifft, den vorläufigen Schluß zu, daß die Ausbildung von Disulfidbrücken, durch Reaktion der OH-Radikale, für die Aggregatentstehung eine untergeordnete Rolle spielt. Geht man ferner davon aus, daß der Zusatz von SDS zur Proteinlösung die Ausbildung von nicht-kovalenten Bindungen verhindert (= Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen), so können ausnahmslos kovalente Bindungen (z.B. -C-C-, -C-S-Bin-

dungen) für die intra- und intermolekularen Veränderungen angenommen werden.

Ziel dieser Beschreibung war es, anhand der einzelnen Kurven ein dynamisches Konzept für die verschiedenen Veränderungen an den Proteinmolekülen zu entwickeln. Es soll versucht werden, dieses Konzept auch für die anderen Versuchsbedingungen anzuwenden.

3.2.3. Bestrahlung bei einem pH-Wert von 8.2

3.2.3.1. Deskriptive Auswertung der Elektropherogramme

Im folgenden Abschnitt sind die Ergebnisse dargestellt, die bei der Radiolyse unter N_2O und einem pH-Wert von 8.2, bei sonst gleichen Bedingungen, gefunden wurden.

Abbildung 9 zeigt die Elektropherogramme bei diesem pH-Wert. Die Aufteilung entspricht den Kurven bei pH 6.3 (Abb. 2), mit denen sie verglichen werden sollen. Es zeigen sich schon auf den ersten Blick einige unmittelbare Auffälligkeiten, die einen Unterschied zur Versuchsreihe bei pH 6.3 vermuten lassen. Beginnt man beim Frontpeak, so erkennt man auch hier wieder eine Zunahme, allerdings nimmt der Peak mit höherer Dosis eine gleichbleibende Größe ein, ohne daß eine Verringerung des Maximalwertes, wie in Abbildung 2, deutlich wird. Vergleicht man den Hauptpeak in den einzelnen Kurven miteinander, so fällt zu Beginn schon auf, daß dieser noch nach einer Dosis von 1760 Gy nachweisbar bleibt. Entsprechend

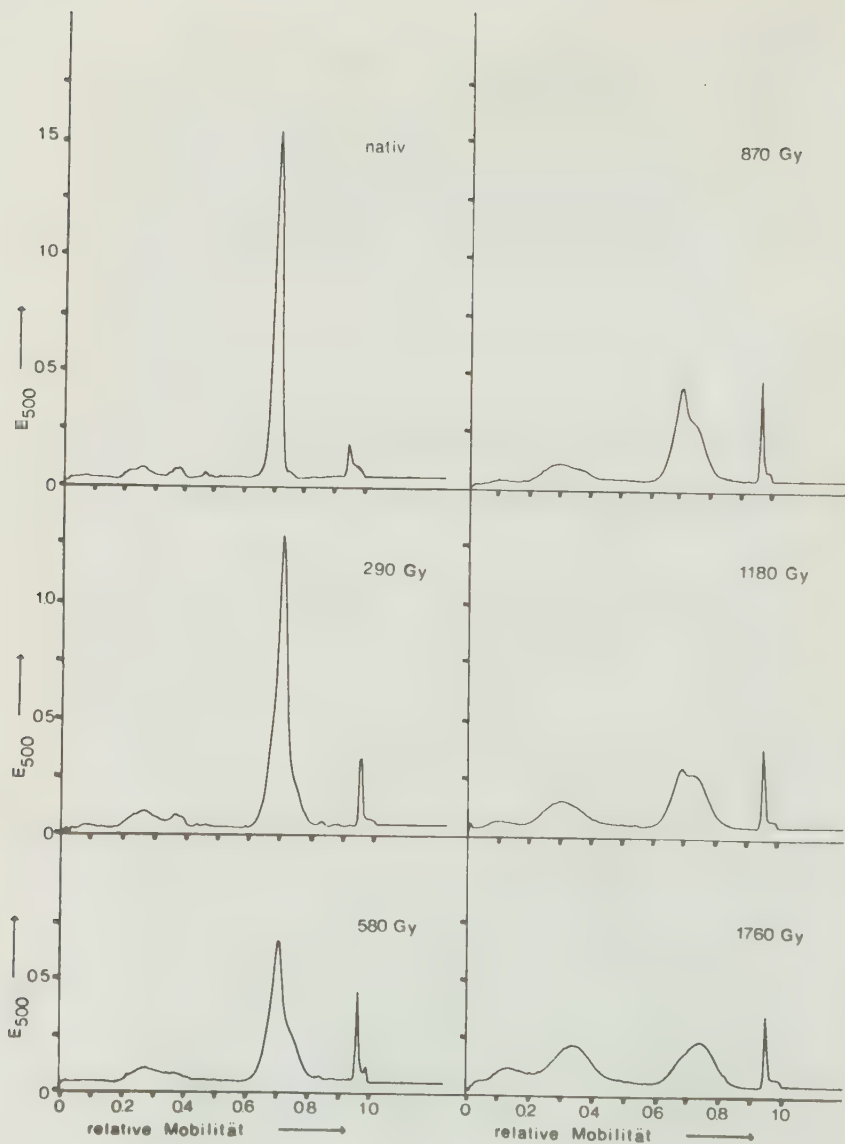


Abb. 9: Elektropherogramme RSA / N_2O / pH 8.2
Versuchsreihe ohne Reduktion

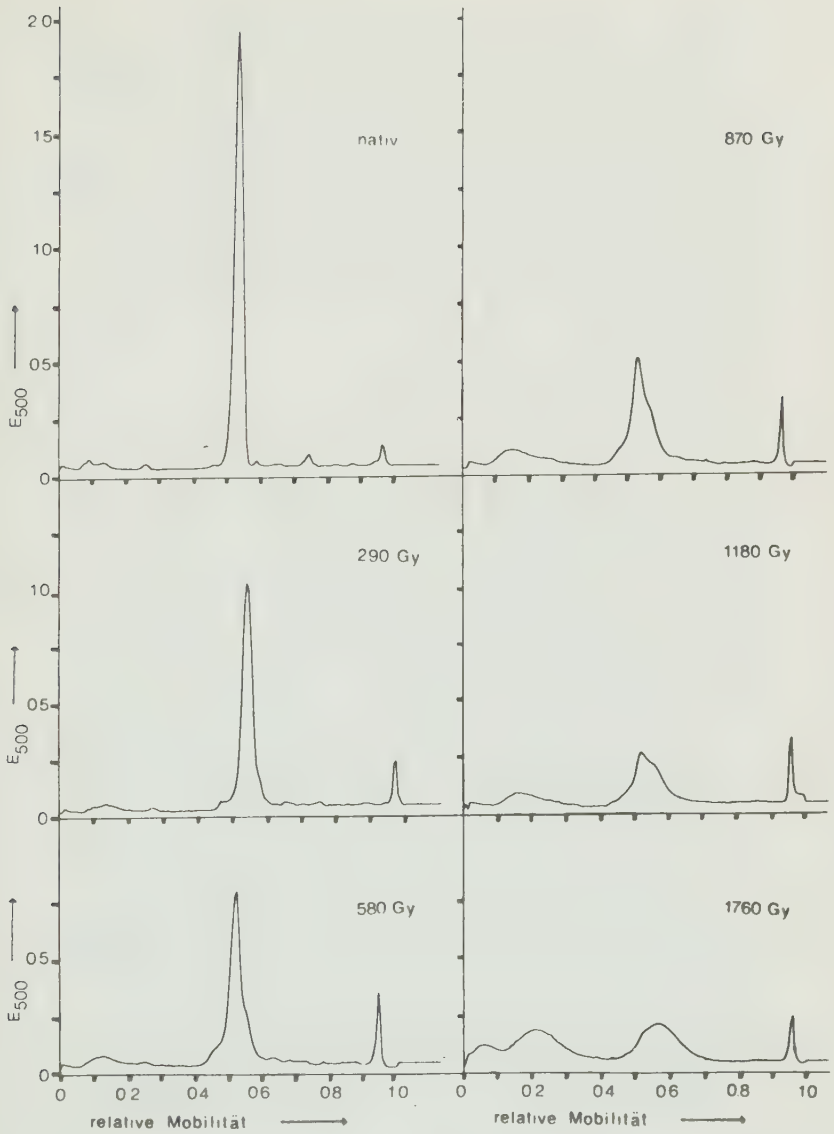


Abb. 10: Elektropherogramme RSA / N_2O / pH 8.2
Versuchsreihe mit Reduktion

nimmt er in den anderen Kurven auch langsamer an Höhe ab. Auffallend ist ferner die schon bei pH 6.3 beobachtete Ausbildung einer Schulter in Richtung Front, unabhängig von der Verbreiterung der Peakbasis. Vergleicht man die Höhe der Schulter (z.B. bei einer Dosis von 870 Gy), so ist sie bei pH 8.2 deutlich ausgeprägter zu finden. Verfolgt man ihre Veränderungen ab einer Dosis von 290 Gy bis 1180 Gy, so erscheint sie fast unverändert, während der ursprüngliche Hauptpeak zusehends an Höhe verliert. Diese Beobachtung gewinnt an Bedeutung, wenn man den RF-Wert der eigentlichen Hauptpeakspitze mit zunehmender Dosis vergleicht. Man sieht, daß dieser Wert bis zu einer Dosis von ca. 1180 Gy konstant bei 0.7 - 0.72 anzusetzen ist. In der Kurve für die 1760-Gy-Dosis verschwindet diese Spitze in dem breit ausladenden Peak, dessen höchster Punkt plötzlich nach vorn, zu einem RF-Wert von 0.75, verschoben erscheint. Offensichtlich bildet jetzt die erwähnte Schulter den Hauptanteil des verbleibenden Peaks. Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden pH-Werten zeigt sich beim Vergleich der Aggregatpeakgruppen. Während sich im sauren Bereich eine Dreiergruppierung mit steigender Tendenz zu den schweren Molekülaggregaten herausbildet, wird bei alkalischem pH nur eine zweigipflige Aggregatgruppe mit Bevorzugung der leichteren Verbindungen beobachtet. Diese bestehen, gemäß Eichkurve in Abbildung 38, im Aggregatpeak I wiederum aus Dimeren und im Aggregatpeak II aus Trimeren. Ein Vergleich mit den Kurven der Versuchsreihe nach Reduktion (Abb. 10) bestätigt die für pH 6.3 getroffenen Feststellungen, daß kein Unterschied zwischen den Versuchsreihen vor und nach Reduktion erkennbar ist. Neben der Schulterbildung in Richtung

Front ist lediglich eine kleinere Schulter in Richtung Gelanfang zusätzlich erkennbar. Besonders gut sichtbar ist diese Gruppierung in der 580-Gy-Kurve der Abbildung 10. Eine zusätzliche Bedeutung erhält diese Beobachtung aus der Tatsache, daß dieses Muster, mit einer kleineren Schulter am Hauptpeak in Richtung Gelanfang und einer größeren in Richtung Front, auch bei anderen Versuchsbedingungen nach Reduktion (z.B. mit Formiat) bei pH 8.2 nachweisbar wird.

3.2.3.2. Flächen- / Dosisverhalten der Peaks

Die flächenmäßige Auswertung der Peaks ermöglicht einen direkten Vergleich der Kurven für beide pH-Werte. Dazu ist, zur besseren Übersichtlichkeit, der Kurvenverlauf von pH 6.3 in die entsprechenden Kurven des alkalischen pH-Wertes gestrichelt eingezeichnet. Das Flächenverhalten des Frontpeaks zeigt (Abb. 11), im Gegensatz zur deskriptiven Untersuchung, kein abweichendes Verhalten für beide pH-Werte. Diese offensichtliche Übereinstimmung scheint seine Ursache aber eher in technischen Schwierigkeiten bei der Berechnung zu haben (geringe Meßwertezahl, sehr kleine Flächen), so daß hier die qualitativen Aussagen zutreffender erscheinen. Viel deutlichere Unterschiede bringt der Vergleich der Hauptpeakflächen (Abb. 12). Hier erkennt man, daß ein gleicher Abbau der Moleküle bei pH 8.2 höhere Energiedosen benötigt als bei pH 6.3. Dies hat zur Folge, daß nach einer Dosis von 1760 Gy noch etwa 35 % der ursprünglichen Fläche, und damit der RSA-Moleküle, vorhanden sind, gegenüber 5 % in der Vergleichskurve. Das unterschiedliche Flächenver-

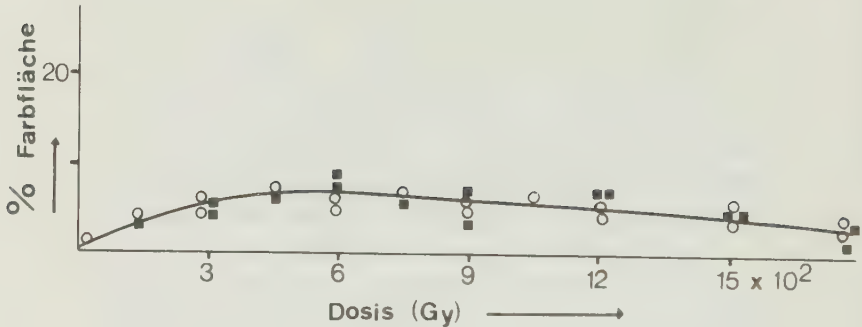


Abb. 11: Flächen-/Dosisverhalten des Frontpeaks
RSA / N₂O / pH 8.2
-○- Versuchsreihe ohne Reduktion
-■- Versuchsreihe mit Reduktion

halten der Aggregatpeaks ergänzt diese Beobachtung. Aus Abbildung 13 geht hervor, daß der Aggregatpeak I im alkalischen Bereich eher und dann auch kontinuierlich ansteigt, während für pH 6.3 ein sprunghafter Anstieg mit Plateau und absteigendem Anteil registriert wurde. Gleiches gilt für Aggregatpeak II, der allerdings erst ab einer Dosis von etwa 600 Gy nachweisbar wird (Abb. 14). Diese Zeichnung enthält darüberhinaus zwei parallele Kurven, die obere für die Aggregate ohne, die untere für die Aggregate mit Reduktion, die auf einen scheinbaren Unterschied zwischen diesen beiden Bedingungen hindeuten könnten. Vergleicht man aber alle anderen Beobachtungen damit, so erscheint ein tatsächlicher Unterschied für unwahrscheinlich. Vielmehr könnte die kürzere Wander-

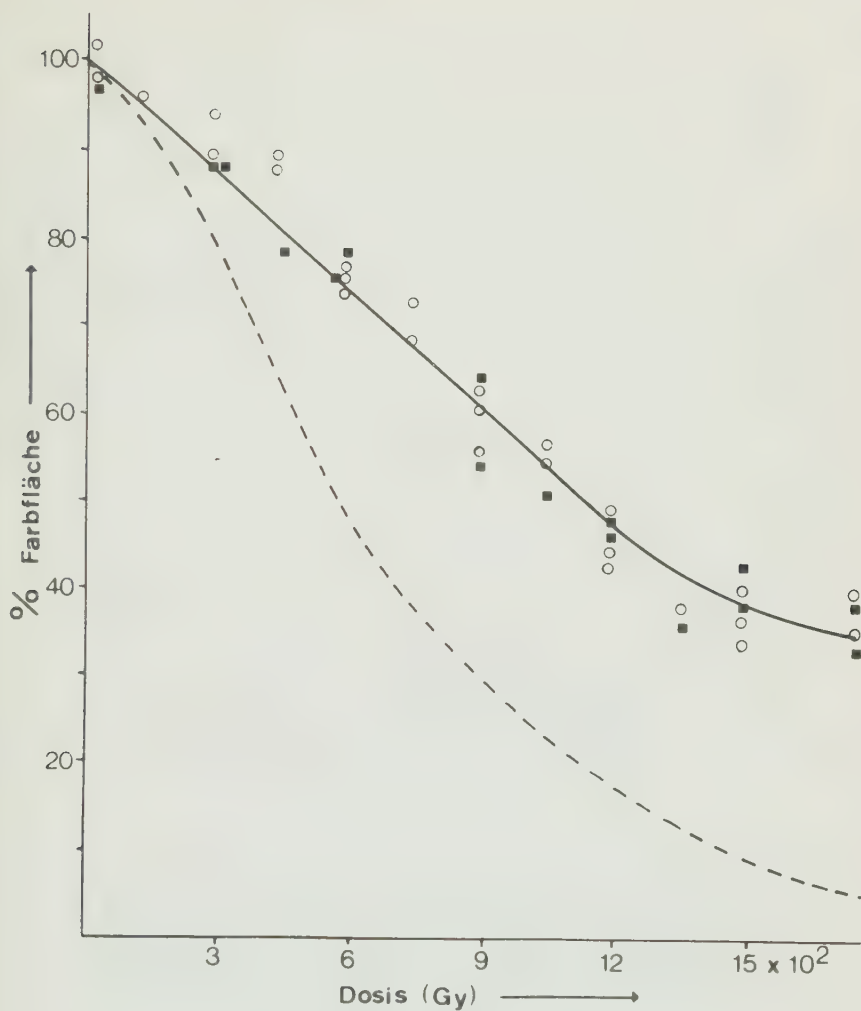


Abb. 12: Flächen-/Dosisverhalten des Hauptpeaks
 RSA / N_2O / Vergleich von pH 8.2 mit pH 6.3
 -○- Versuchsreihe ohne Reduktion
 -■- Versuchsreihe mit Reduktion
 — pH 8.2 ---- pH 6.3

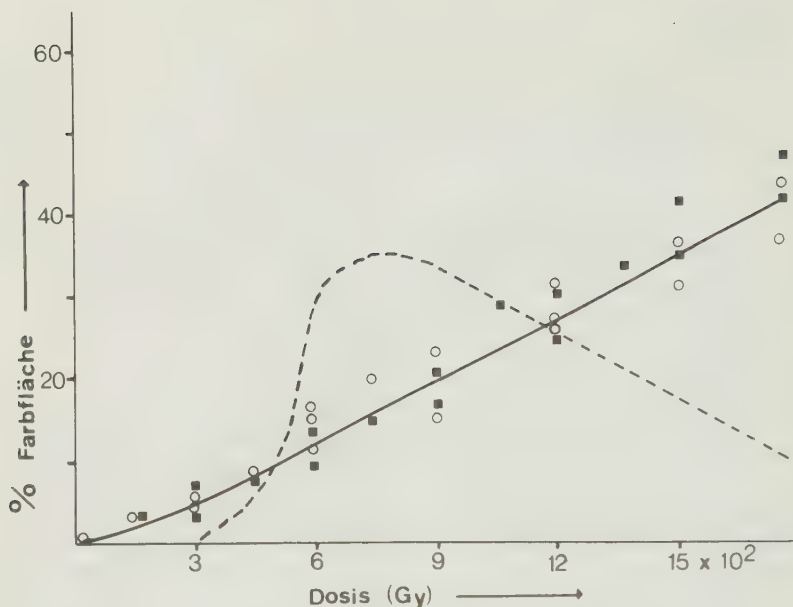


Abb. 13: Flächen-/Dosisverhalten des Aggregatpeaks I
 RSA / N_2O / Vergleich von pH 8.2 mit pH 6.3
 -○- Versuchsreihe ohne Reduktion
 -■- Versuchsreihe mit Reduktion
 — pH 8.2 ---- pH 6.3

strecke der reduzierten Peaks (vgl. 3.2.2.1.) und damit geringeres Einwandern am Gelanfang für diese Erscheinung verantwortlich sein.

Faßt man diese Beobachtungen zusammen, so erhält man folgende Ergebnisse. Der Abbau der RSA-Moleküle benötigt im Alkalischen höhere Energiedosen als im Säuren. Die Veränderungen an den Molekülen bewirken wiederum

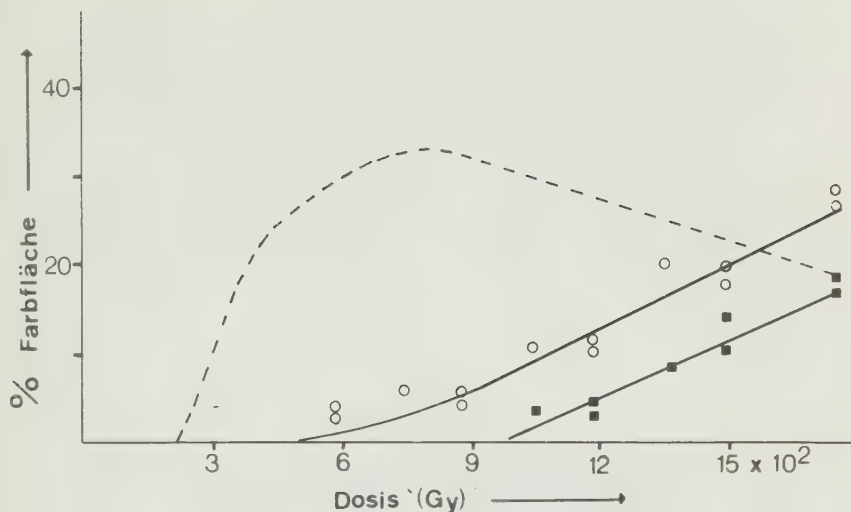


Abb. 14: Flächen-/Dosisverhalten des Aggregatpeaks II
 RSA / N₂O / Vergleich von pH 8.2 mit pH 6.3
 -○- Versuchsreihe ohne Reduktion
 -■- Versuchsreihe mit Reduktion
 — pH 8.2 ---- pH 6.3

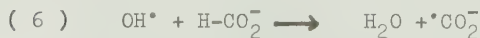
die Ausbildung von Bruchstücken, die in der Front nachweisbar sind, und die Aggregation von Molekülen. Dabei wird im sauren pH-Bereich die Aggregation zu Dimeren bevorzugt, im höheren Dosisbereich auch die Ausbildung von Trimeren und Tetrameren. Im Unterschied dazu reicht die Energiedosis im Alkalischen offenbar nicht aus, diese niedermolekularen Aggregate wieder abzubauen und in höhermolekulare umzuwandeln. Entsprechend gelingt es nicht, einen Peak

dieser Molekulargewichtsgruppe (vergleichbar Aggregatpeak III) nachzuweisen. Gleiche RF-Werte für Aggregatpeak I und II bei beiden pH-Werten entkräften auch das Argument, daß ein dritter Aggregatpeak nur aufgrund geringerer Wanderstrecke der übrigen Peaks nicht nachweisbar wäre. Schließlich weist auch die Addition der einzelnen Peakflächen gleicher Dosis auf keinen größeren Flächenverlust hin, der mit der Existenz eines dritten Aggregatpeaks zu begründen wäre.

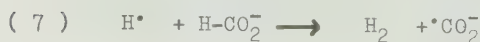
3.3. Bestrahlung von Serumalbumin unter N_2O -Gas mit Zusatz von Formiat

3.3.1. Radikale

Wie unter Punkt 3.2. bereits erläutert, können die bei der Wasserradiolyse entstehenden hydratisierten Elektronen durch Zusatz einer N_2O -Gasatmosphäre in OH-Radikale umgewandelt werden, so daß diese, zusammen mit dem kleinen Anteil an H-Radikalen, für Reaktionen mit dem Protein zur Verfügung stehen. Durch Zugabe von 10^{-1} M Formiat gelingt es, diese beiden Radikale ebenfalls abzufangen. Dies geschieht nach folgenden Gleichungen:



$$k = 2.8 \times 10^9 \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$$



Die Geschwindigkeitskonstante für die Reaktion (7) beträgt dabei $2.2 \times 10^8 \text{ (M}^{-1} \text{ s}^{-1}\text{)}$.

Für die Reaktion mit den RSA-Molekülen stehen also nur noch Formiat-Radikale zur Verfügung. Die Versuchsbedingungen entsprachen denen bei Bestrahlung unter N_2O ohne Formiat. Es wurde bis zu einer Dosis von 1760 Gy bestrahlt, wobei zwischendurch Proben entnommen und nach beschriebener Art untersucht wurden. Zunächst sollen die Ergebnisse für pH 6.3 dargestellt werden.

3.3.2. Bestrahlung bei pH 6.3

3.3.2.1. Elektropherogramme der Versuchsreihe ohne Reduktion

Abbildung 15 zeigt die Elektropherogramme bei Bestrahlung der RSA-Lösung unter N_2O -Gas und Zusatz von Formiat. Beginnt man die Beschreibung wieder bei den Frontpeaks, so erkennt man eine geringe Größenzunahme mit steigender Dosis, die sich aber bei höheren Dosen wieder zurückbildet. Ähnlich wie bei der gleichen Versuchsreihe, nur unter N_2O -Gas, scheint hier ein Reaktionsmechanismus zu bestehen, der diese Bruchstücke erzeugt, wobei der Rückgang wiederum auf gleichzeitig erfolgten Abbau des Hauptpeaks zurückzuführen ist.

Der Hauptpeak zeigt in der Versuchsreihe ohne Reduktion eine starke Abnahme, die eine maximale Ausprägung im Dosisbereich bis 290 Gy erfährt (siehe Kurve 29 Gy), und die dann nur noch langsam fortschreitet. Auffallend ist die ausgesprochen symme-

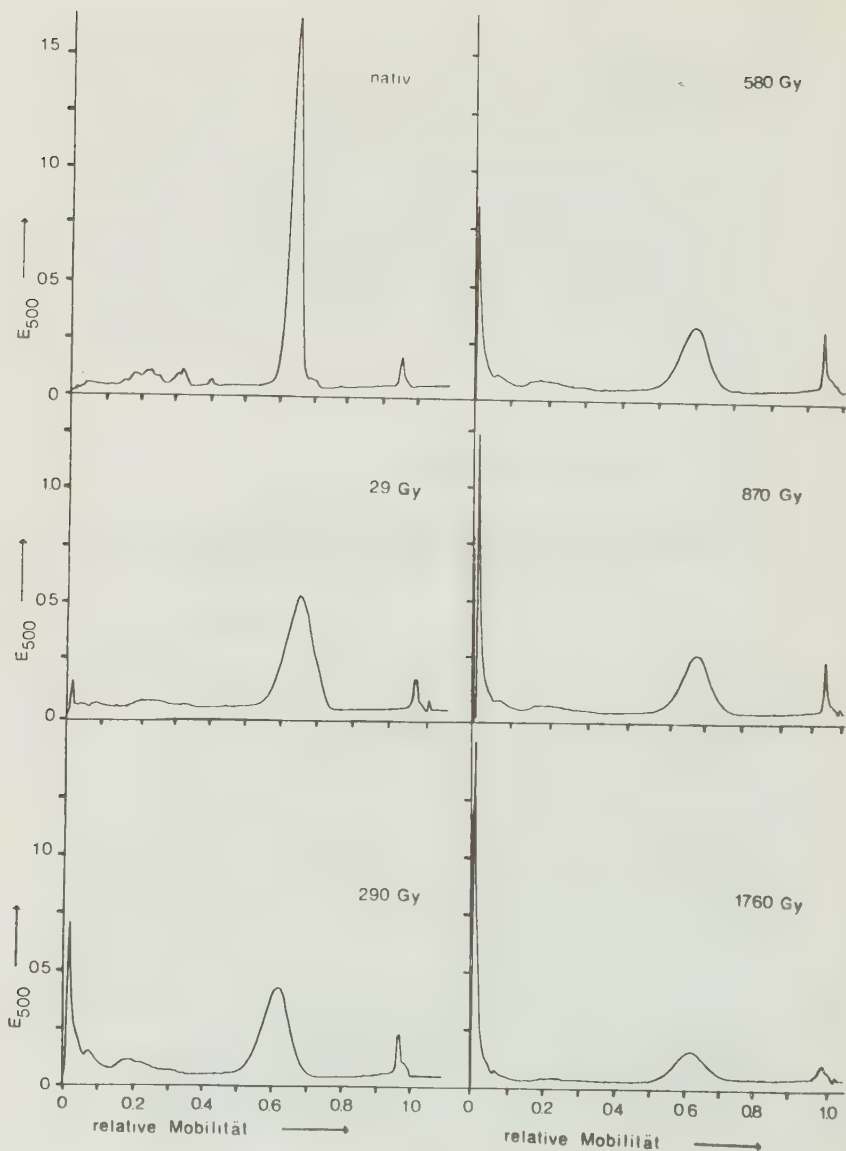


Abb. 15: Elektropherogramme RSA / N_2O / Formiat / pH 6.3
Versuchsreihe ohne Reduktion

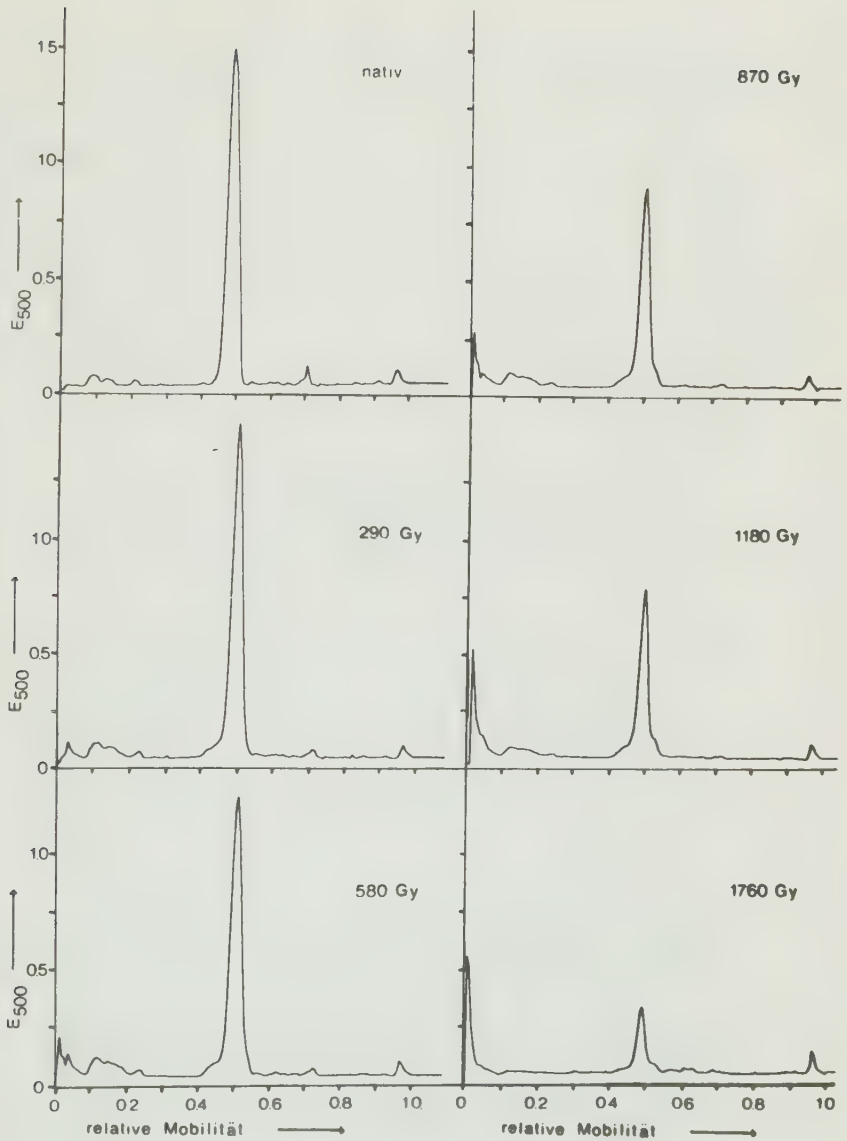


Abb. 16: Elektropherogramme RSA / N_2O / Formiat / pH 6.3
Versuchsreihe mit Reduktion

trische und abgerundete Peakform mit einer relativ breiten Basis. Legt man räumliche Molekülgröße und Molekulargewicht als Maßstab für die Wanderungsstrecke im Gel zugrunde, so scheint hier eine statistische Verteilung von Molekülen vorzuliegen, die mit geringgradigen Modifikationen um den Mittelwert, dem unveränderten RSA-Molekül, schwanken. Die relative Konstanz der Peakbasis über den gesamten Dosisbereich (siehe 29-Gy-Kurve bis 1760-Gy-Kurve) bestätigt, daß diese Modifikationen nur in einem bestimmten Rahmen erfolgen können. Was darüber hinausgeht, führt schnell zur Bildung von Aggregaten, die, im Gegensatz zur Untersuchung der OH-Radikalwirkung, schon bei sehr niedrigen Dosen (29-Gy-Kurve) nachweisbar sind. Verfolgt man diese Aggregatbildung, so erkennt man wieder die Ausbildung einer Dreiergruppierung. Abbildung 38 (Eichkurve) bestätigt die Vermutung, daß es sich hier, ähnlich den Ergebnissen unter Punkt 3.2.1.1., um Dimere, Trimere und Tetramere handelt. Überraschend ist dagegen die schnelle Ausbildung hochmolekularer Aggregate (s. Aggregatpeak II in 290-Gy-Kurve). Der ständige Zuwachs in diesem Peak wird begleitet von der Abnahme des Hauptpeaks über den ganzen, und von einer Abnahme des Aggregatpeaks I und II im oberen Dosisbereich.

3.3.2.2. Flächen-/Dosiskurven der Versuchsreihe ohne Reduktion

Die Flächen-/Dosiskurven bestätigen die oben getroffenen Feststellungen. Abbildung 17 zeigt das Verhalten der Frontpeaks. Mit einem Anteil von maximal 5 % spielen sie eine untergeordnete Rolle.

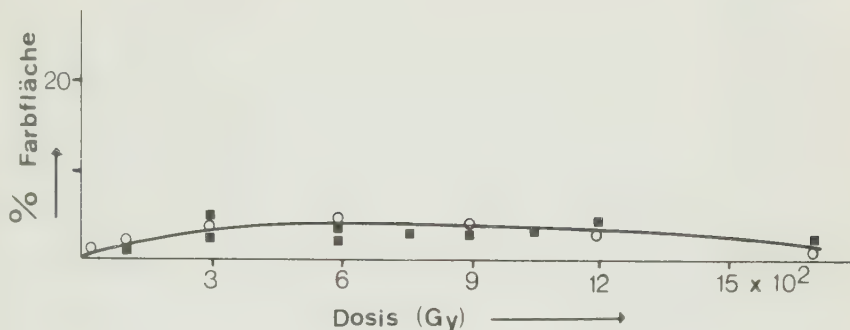


Abb. 17: Flächen-/Dosisverhalten des Frontpeaks
 RSA / N₂O/Vergleich von pH 6.3 und pH 8.2
 Versuchsreihe ohne Reduktion
 -○- pH 6.3 -■- pH 8.2

Abbildung 18 zeigt den flächenmäßigen Abbau des Hauptpeaks. Man erkennt, wie schon in den Elektropherogrammen, daß die stärksten Modifikationen im Dosisbereich bis etwa 300 Gy auftreten, bemerkbar an dem Abfall der Kurve bis auf etwa 60 % der ursprünglichen Fläche. Ab diesem Punkt beginnt eine kontinuierliche Abbauphase, die auch langsamer verläuft, so daß nach einer Dosis von 1760 Gy noch circa 25 % der Fläche des unbestrahlten Peaks vorhanden sind.

Vergleicht man damit das Verhalten der Aggregatpeaks (Abb. 19 a-c), so findet man einen korrelierenden Verlauf ihrer Flächen-/Dosiskurven. Alle drei Kurven weisen einen steilen Anstieg im Dosisbereich bis 300 Gy auf, dem Bereich, mit dem stärksten Abbau im

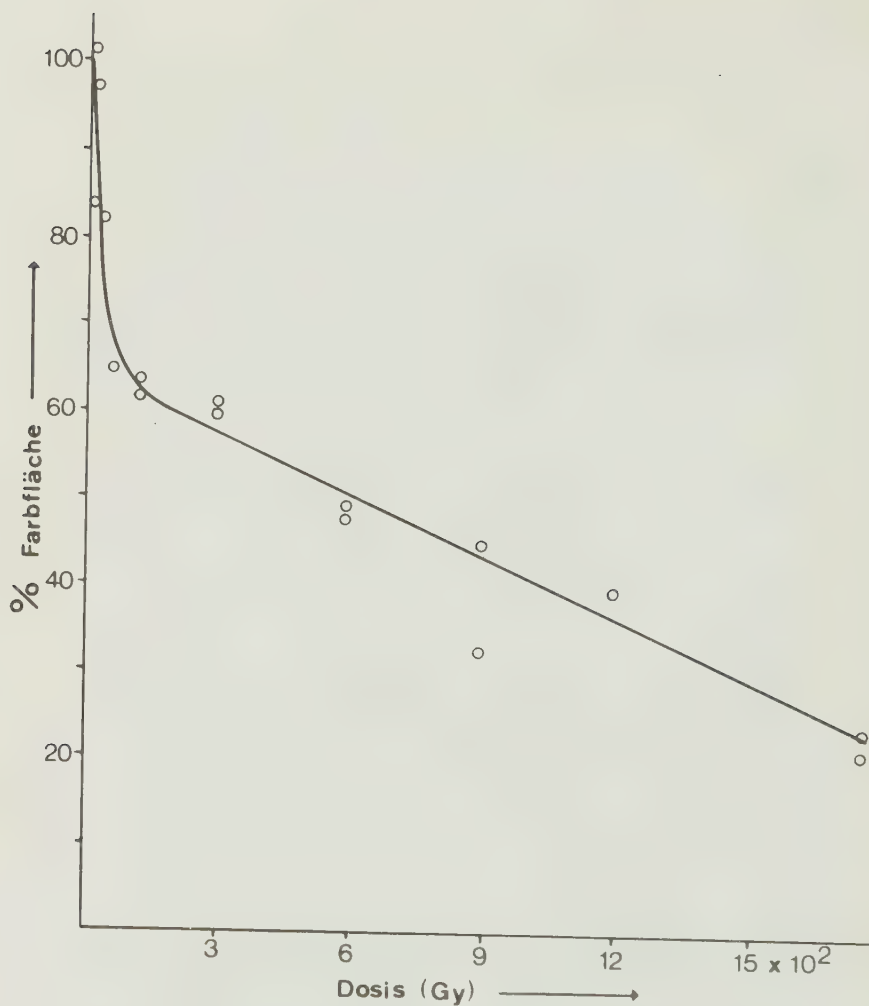


Abb. 18: Flächen-/Dosisverhalten des Hauptpeaks
RSA / N₂O / Formiat / pH 6.3
-○- Versuchsreihe ohne Reduktion

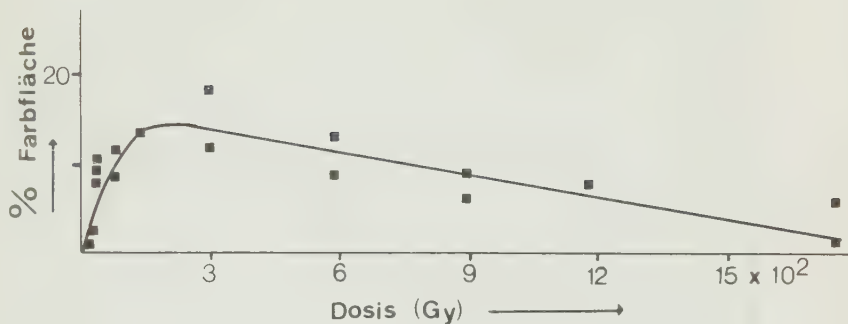


Abb. 19 (a): Flächen-/Dosisverhalten des Aggr.-Peak I
 RSA / N₂O / Formiat / pH 6.3
 -■- Versuchsreihe ohne Reduktion

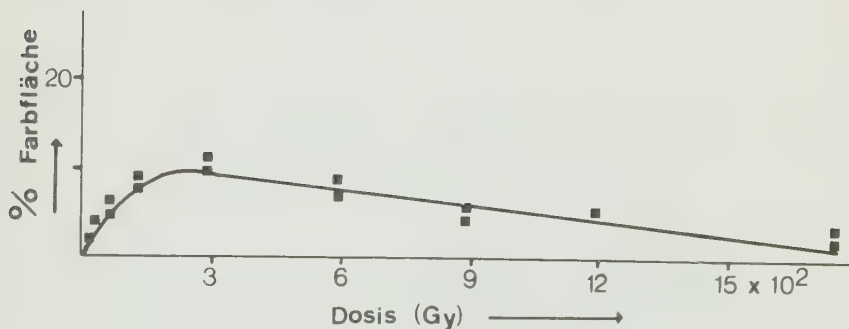


Abb. 19 (b): Flächen-/Dosisverhalten des Aggr.-Peak II
 RSA / N₂O / Formiat / pH 6.3
 -■- Versuchsreihe ohne Reduktion

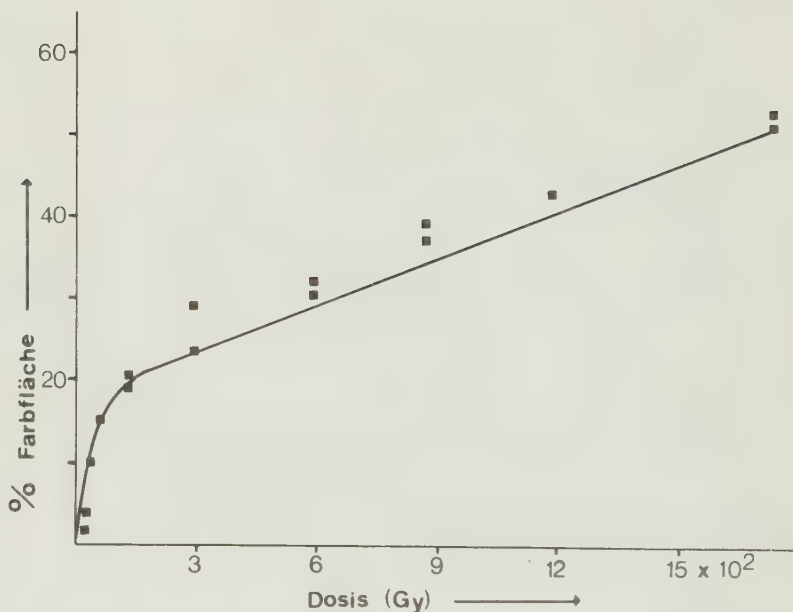


Abb. 19 (c): Flächen-/Dosisverhalten des Aggr.-Peak III
RSA / N₂O / Formiat / pH 6.3
-■- Versuchsreihe ohne Reduktion

Hauptpeak. Dies legt die Vermutung nahe, daß die RSA-Moleküle des Hauptpeaks in diesem niedrigen Dosisbereich schon Modifikationen erfahren, die zu ihrer Aggregation führen. Anders als bei den N₂O-Ver-suchen tritt eine sofortige Bevorzugung höhermoleku-larer Aggregate ein, wie aus den Prozentangaben (ca. 13 % für Aggregatpeak I, 10 % für II, aber 22 % für Aggregatpeak III) für diesen Bereich sichtbar wird.

Dem flacher verlaufenden Abbau des Hauptpeaks entspricht ein konstanter Anstieg im Aggregatpeak III, verbunden mit einem entsprechenden Abfall im Aggregatpeak I und II. Das Bild gleicht weitgehend den Beobachtungen, wie sie für die N_2O -Versuche gemacht wurden: im höheren Dosisbereich überwiegt der Abbau der Aggregatpeaks I und II den Zustrom aus dem Hauptpeak, wobei Aggregatpeak III die entstehenden Modifikationen aufnimmt.

Es muß betont werden, daß diese Beobachtungen zunächst nur für die Versuchsreihe ohne Reduktion gelten, während sich für die Messungen mit Reduktion einige Unterschiede herausstellen.

3.3.2.3. Elektropherogramme der Versuchsreihe mit Reduktion

Abbildung 16 zeigt die Kurven für diese Versuchsreihe. Im Vergleich mit Abbildung 15 sind einige wesentliche Unterschiede sichtbar.

Bei den Frontpeaks sind, im Gegensatz zu Abbildung 15, über den ganzen Dosisbereich keine auffallenden Größenänderungen festzustellen. Bei den Hauptpeaks sind diese Unterschiede dagegen am deutlichsten. Hier erkennt man, daß im Dosisbereich bis etwa 580 Gy die Modifikationen der RSA-Moleküle nach Reduktion fast vollständig zurückgebildet werden können. Besonders deutlich sieht man diese Erscheinung an der spitzen, schlanken Form der Peaks nach Reduktion, im Gegensatz zu den flachen und breiten Peaks vor der Reduktion. Diese Rückbildungsfähigkeit im Hauptpeak wiederholt sich bei den Aggregatpeaks (vgl. 290-Gy-

Kurve). Erst ab der 870-Gy-Kurve erkennt man einen stärkeren Abbau des Hauptpeaks, verbunden mit der Ausbildung von Aggregaten auch nach Reduktion. Trotzdem behalten die Hauptpeaks ihre schlanke Form über den gesamten Dosisbereich. Auffällig ist auch hier wieder die Ausbildung einer Schulter, wie sie schon nach Bestrahlung bei pH 8.2 unter N_2O und Reduktion zu sehen war.

Die Aggregate, die, wie beschrieben, bei Reduktion erst nach höheren Dosen entstehen, wirken, im Vergleich zu denen in Abbildung 15, zerklüfteter und spitzer (vgl. 290-Gy- und 870-Gy-Kurve), und erreichen nach voller Dosis nicht die Höhe der Peaks vor Reduktion. Trotzdem läßt sich wieder die Dreierstruktur nachweisen. Ein kleiner vierter Peak, der besonders in den Kurven mit 580 Gy bis 1180 Gy bei $RF = 0.23$ zu sehen ist, stellt sich bei der Flächenauswertung als ein konstant großes Gebilde heraus und ist, aller Wahrscheinlichkeit nach, auf eine Verunreinigung im Proteinmaterial zurückzuführen.

3.3.2.4. Flächen-/Dosiskurven für die Versuchsreihe mit Reduktion

Auffallendstes Kriterium bei den Versuchen ohne Reduktion war der steile Abfall in der Fläche des Hauptpeaks und ein damit verbundener steiler Anstieg bei den Aggregatpeaks, wobei beides schon bei sehr niedriger Dosis auftrat. Die qualitative Beschreibung der Elektropherogramme läßt vermuten, daß auch bei der Flächenauswertung Unterschiede zwischen den unreduzierten und den reduzierten Bestrahlungsprodukten zu erwarten sind.

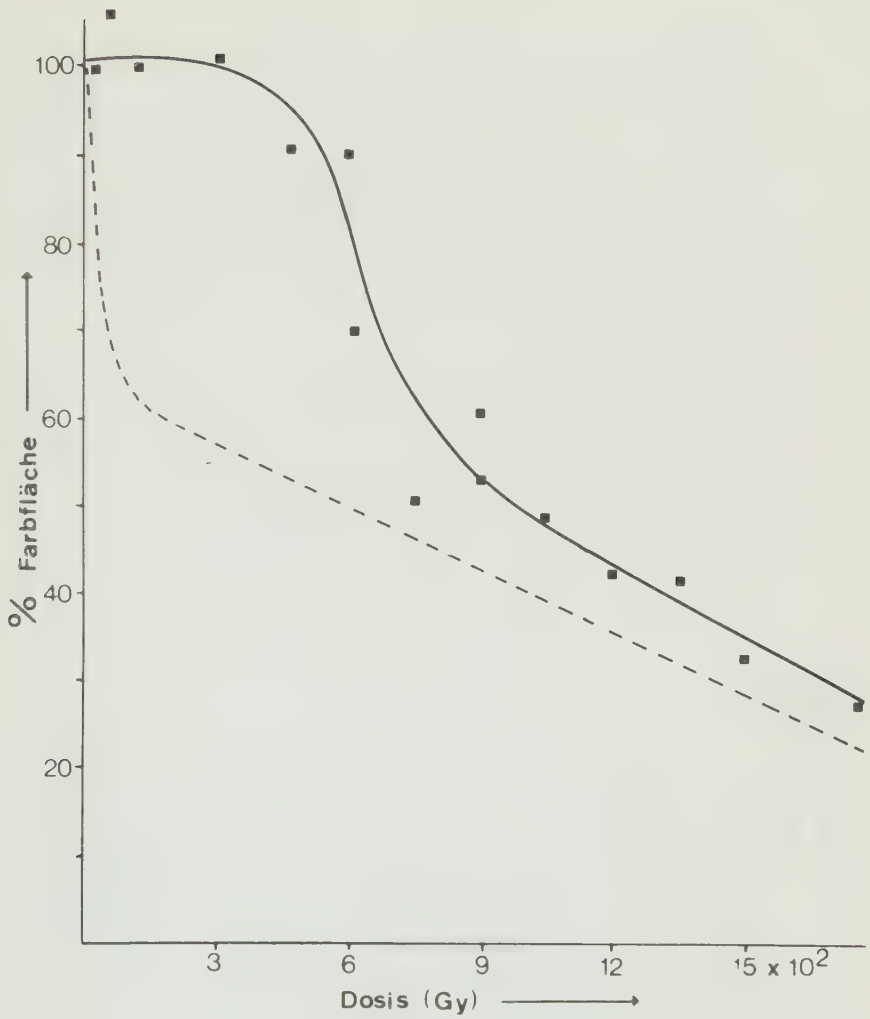


Abb. 20: Flächen-/Dosisverhältnis des Hauptpeaks
RSA / N₂O / Formiat / pH 6.3
-■- Versuchsreihe mit Reduktion
--- Versuchsreihe ohne Reduktion

Abbildung 20 zeigt die Abnahme der Hauptpeakfläche nach Reduktion im Vergleich zur, gestrichelt gezeichneten, Kurve für die Reihe ohne Reduktion. Es bestätigt sich, daß die Modifikationen der RSA-Moleküle in einem Bereich bis etwa 500 Gy voll rückbildungsfähig sind, bevor auch hier ein stärkerer Abfall der Kurve auftritt. Vergleicht man beide Kurven, so entsteht der Eindruck, als ob die Kurve nach Reduktion parallel zu der vor Reduktion in Richtung auf eine höhere Dosis verschoben ist. Dieser Eindruck wiederholt sich bei den Kurven der Aggregatpeaks (Abb. 21 a-c). Aggregatpeak I und II zeigen das gleiche Muster wie im unreduzierten Fall, mit einer steilen Anstiegsphase und einem konstanten Abfall, lediglich um etwa 400 Gy auf der X-Achse nach rechts verschoben. Auch Aggregatpeak III zeigt entsprechendes Verhalten, wenngleich sein Anstieg weniger steil erfolgt.

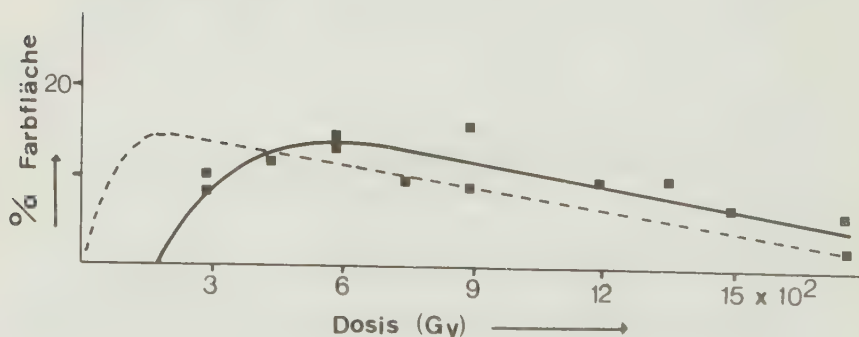


Abb. 21 (a): Flächen-/Dosisverhalten des Aggr.-Peak I
 RSA / N₂O / Formiat / pH 6.3
 -■- Versuchsreihe mit Reduktion
 --- Versuchsreihe ohne Reduktion

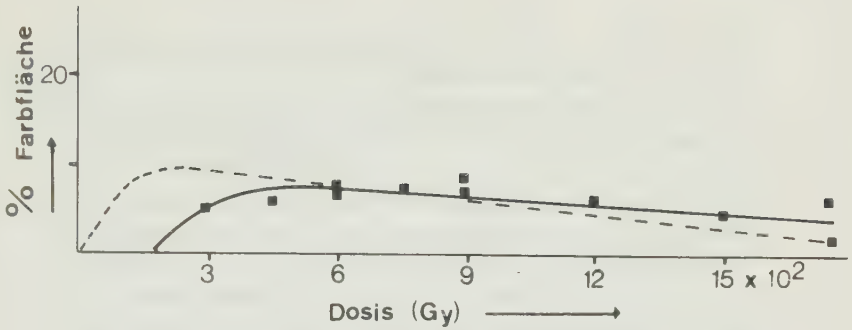


Abb. 21 (b): Flächen-/Dosisverhalten des Aggr.-Peak II
RSA / N₂O / Formiat / pH 6.3
- ■ - Versuchsreihe mit Reduktion
- - - Versuchsreihe ohne Reduktion

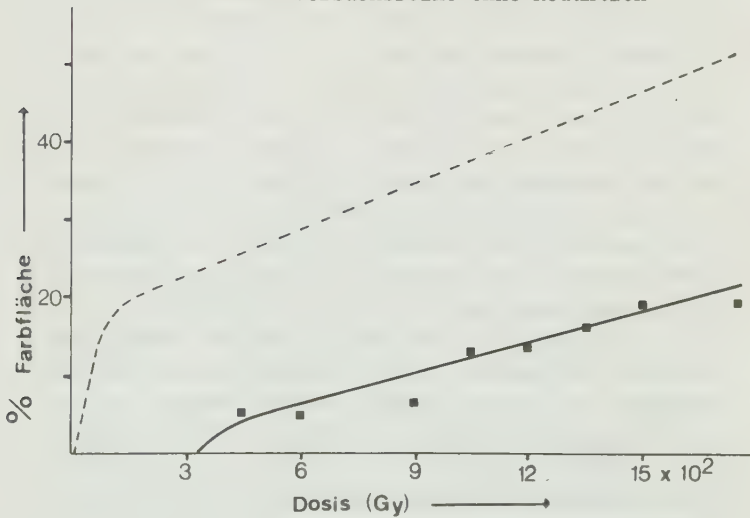


Abb. 21 (c): Flächen-/Dosisverhalten des Aggr.-Peak III
RSA / N₂O / Formiat / pH 6.3
- ■ - Versuchsreihe mit Reduktion
- - - Versuchsreihe ohne Reduktion

Nach Reduktion ist der Frontpeak bei pH 6,3 quantitativ nicht mehr nachweisbar.

Die Ergebnisse lassen sich zu folgendem Bild zusammenfassen. Der Abbau der RSA-Moleküle durch Einwirkung von Formiat-Radikalen erfolgt bei den Versuchen ohne Reduktion schon bei niedriger Dosis in einem sehr hohen Maß. Diese Phase ist bei Reduktion voll rückbildungsfähig, wiederholt sich aber bei höherer Dosis in abgeschwächter Form. Legt man, ohne einer näheren Interpretation vorgreifen zu wollen, zugrunde, daß bei Reduktion die Disulfidbrücken im und zwischen Molekülen zerstört werden, so ist diese schnelle Modifikationsphase in erster Linie auf die Ausbildung solcher Brücken zurückzuführen. Sie verursacht unmittelbar die Entstehung von Aggregaten, die durch Reduktion ebenfalls zerstört werden können. Die freierwerdenden Moleküle sind erneut im Hauptpeak zu finden, wie die ausgeprägte Schulter der reduzierten Kurve in Abbildung 20 beweist. Es muß auch angenommen werden, daß die Basisverbreiterung der Peaks, die ja nach Reduktion ebenfalls verschwindet, durch intramolekulare Disulfidbrücken verursacht wird.

Ab einer Dosis von 400-600 Gy treten in den Molekülen Veränderungen auf, die anderer Natur als Disulfidbrücken sein müssen, da sie nicht durch Reduktion zerstörbar sind. Es überrascht allerdings, daß diese Veränderungen sowohl im Hauptpeak, wie in den Aggregatpeaks, das gleiche Muster zeigen, nämlich eine steile Anstiegsphase mit nachfolgend flacherem Kurvenverlauf. Dies ließe die Vermutung zu, daß hier zwei verschiedene Reaktionswege unterschiedlicher Geschwindigkeit ablaufen.

3.3.3. Bestrahlung bei pH 8.2

3.3.3.1. Deskriptive Auswertung der Elektropherogramme

Abbildung 22 zeigt die Elektropherogramme für die Versuchsreihe ohne Reduktion bei pH 8.2. Qualitativ ähneln sie denjenigen des sauren pH-Wertes. Man erkennt wieder einen starken Abbau im niedrigen Dosisbereich, verbunden mit der Ausbildung von Aggregaten. Ein Frontpeak wird mit höherer Dosis ebenfalls nachweisbar. Bei den Aggregatpeaks wird wiederum die Dreiergruppierung sichtbar, allerdings entsteht der Eindruck, daß bei hoher Dosis die Aggregatpeaks I und II ebenfalls weiter zunehmen und nicht abgebaut werden. Insgesamt scheinen alle Veränderungen im alkalischen Bereich höhere Dosen zu benötigen als im sauren Bereich.

Unterschiede im Vergleich zu pH 6.3 erkennt man bei den Elektropherogrammen nach Reduktion (Abb. 23). Zunächst bestätigt sich die Rückbildungsfähigkeit der Modifikationen im Hauptpeak und in den Aggregatpeaks bei niedrigerer Dosis. Mit höherer Dosis, sichtbar zum Beispiel ab der 870-Gy-Kurve, tritt eine Erscheinung zutage, die bisher schon öfters beschrieben wurde, die in dieser Ausprägung aber nur unter diesen Voraussetzungen zu finden ist. Gemeint ist die Bildung einer Schulter in Richtung Gelanfang und einer in Richtung Front, wobei letztere als eine vom Hauptpeak getrennte Spitze erscheint. Es besteht kein Zweifel, daß sich dieser Teilpeak aus der ursprünglichen Schulter entwickelt hat und daß er Vertreter für Moleküle ist, die eine ganz charakteristische Modifikation erfahren haben müssen. Auch die

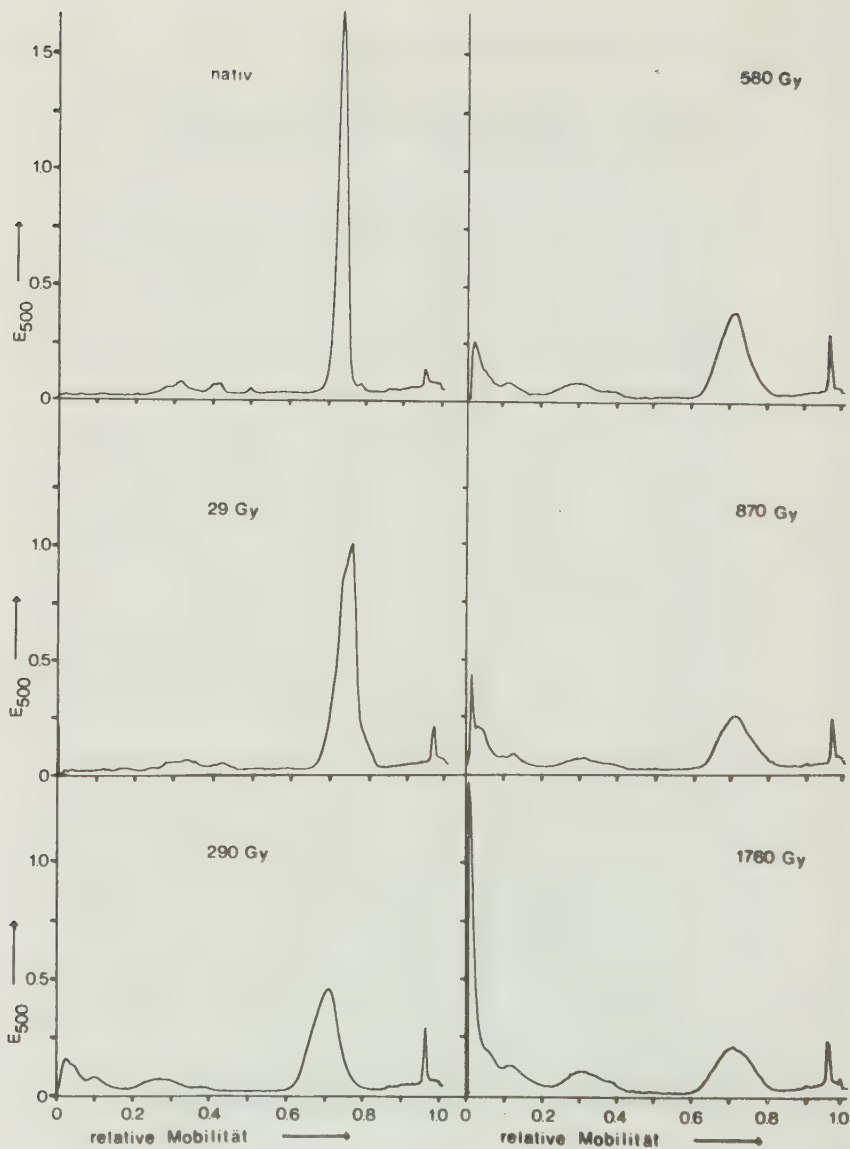


Abb. 22: Elektropherogramme RSA / N_2O / Formiat / pH 8.2
Versuchsreihe ohne Reduktion

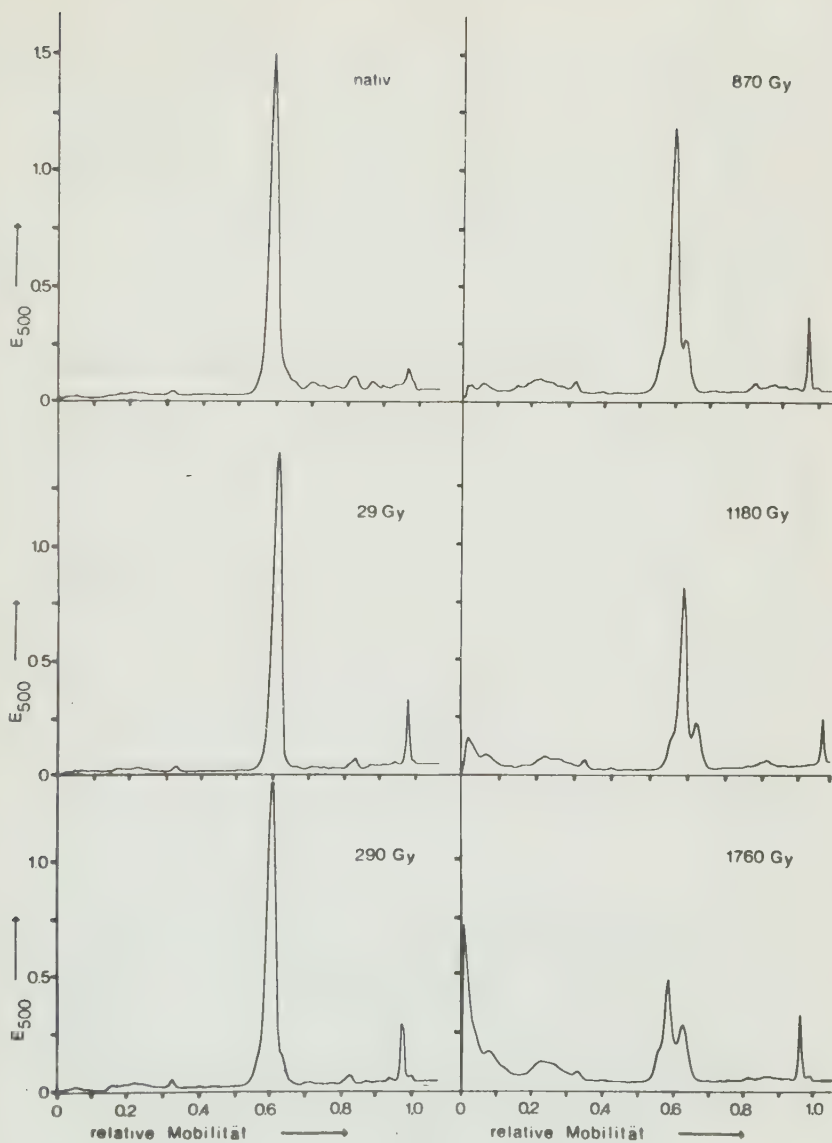


Abb. 23: Elektropherogramme RSA / N_2O / Formiat / pH 8.2
Versuchsreihe mit Reduktion

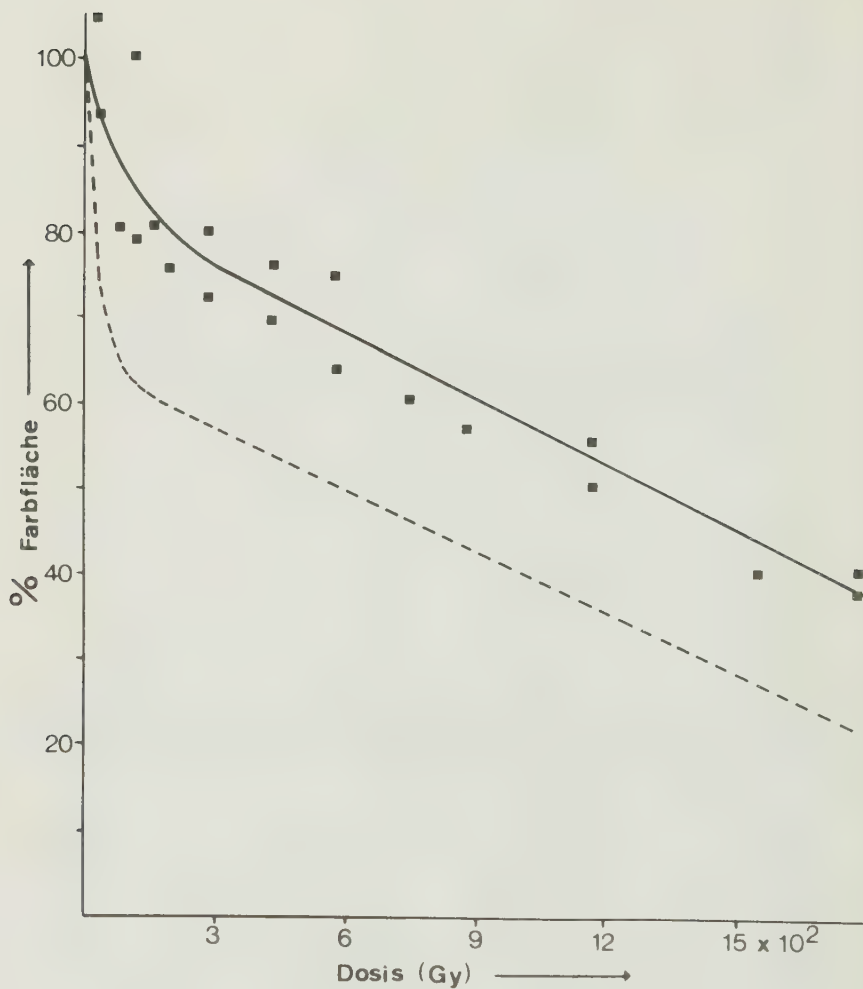


Abb. 24: Flächen-/Dosisverhalten des Hauptpeaks
RSA / N_2O / Formiat / Vergleich von pH 8.2
mit pH 6.3

Versuchsreihe ohne Reduktion

- ■ - pH 8.2

--- pH 6.3

Schulter in Richtung Gelanfang erscheint deutlicher sichtbar als dies bei den anderen Versuchsbedingungen der Fall war.

Der Frontpeak ist stärker ausgeprägt als bei pH 6.3. Bei höherer Dosis unterliegt er aber sowohl vor, als auch nach Reduktion, keinem erneuten Abbau.

3.3.3.2. Flächen- / Dosiskurven der Peaks

Die Abnahme der Hauptpeakfläche benötigt bei pH 8.2 höhere Dosen als bei pH 6.3. Diesen schon qualitativ erhobenen Befund bestätigt Abbildung 24 mit Vergleich beider pH-Werte bei unreduzierten Proben. Dies ließe den Schluß zu, daß die Reaktionsmechanismen prinzipiell die gleichen sind, daß ihr Einfluß aber pH-abhängig ist.

Das Verhalten des Frontpeaks vor Reduktion, verglichen mit pH 6.3, wurde bereits in Abbildung 17 aufgenommen. Die Flächen sind allerdings zu klein, um eventuell vorhandene Unterschiede festzustellen. Anders dagegen die Flächen-/Dosiskurven für die Aggregatpeaks. Abbildung 25 zeigt, im Vergleich zu pH 6.3, einen langsamer verlaufenden Anstieg für Aggregatpeak I und II mit Ausbildung einer Plateauphase, während Aggregatpeak III kontinuierlich ansteigt. Dabei geht der fehlende Abbau in Aggregatpeak I und II offensichtlich auf Kosten eines flächenmäßig kleineren Aggregatpeaks III. Hier weichen also die Ergebnisse für beide pH-Werte voneinander ab.

Nach Reduktion läßt sich, im Gegensatz zu pH 6.3, eine geringe Flächenzunahme des Frontpeaks nachweisen (Abb. 26). Die Abnahme der Hauptpeakfläche (Abb. 27) weicht im Dosisbereich bis etwa 600 Gy nicht von derjenigen

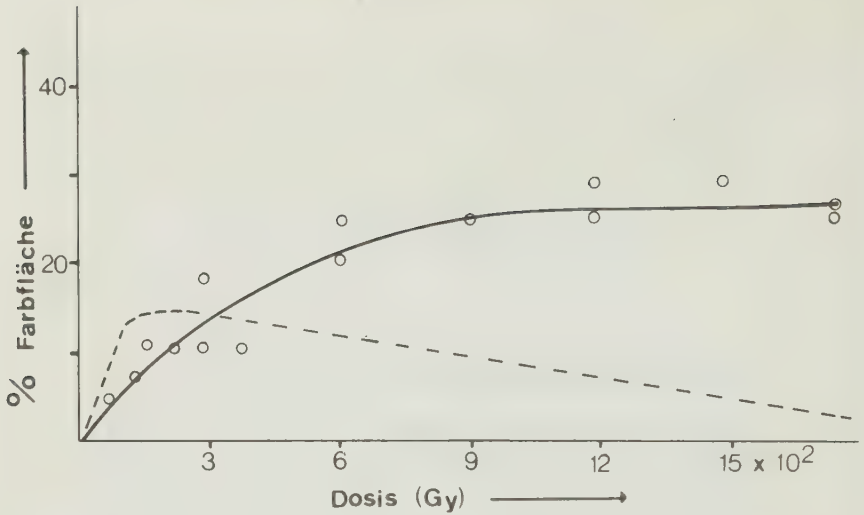


Abb. 25 (a): Flächen-/Dosisverhalten des Aggr.-Peak I

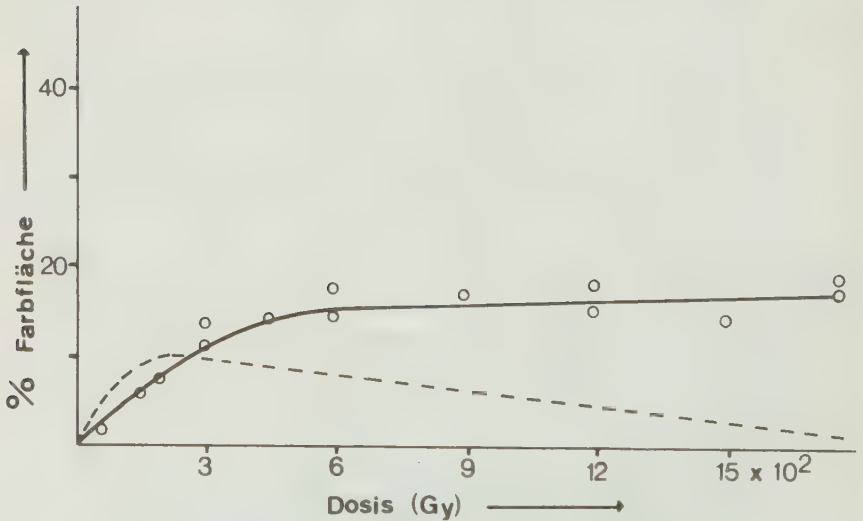


Abb. 25 (b): Flächen-/Dosisverhalten des Aggr.-Peak II
RSA / N₂O / Formiat / Vgl. pH 8.2 mit pH 6.3
Versuchsreihe ohne Reduktion
-○- pH 8.2 --- pH 6.3

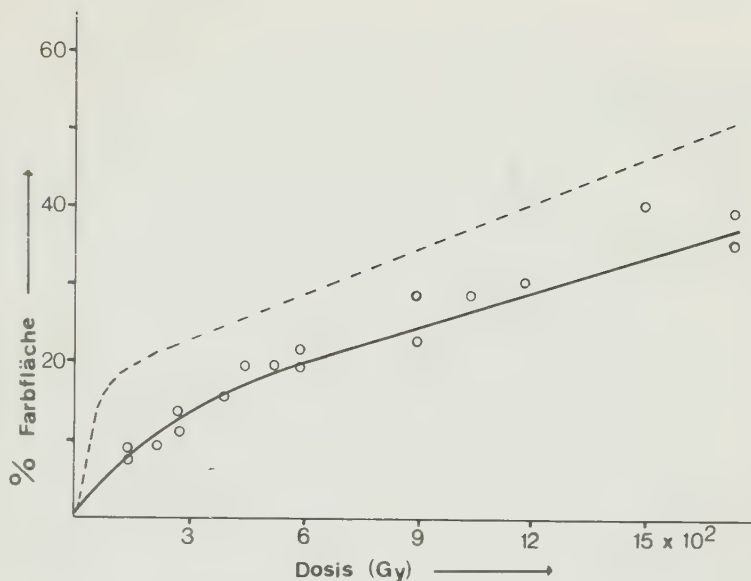


Abb. 25 (c): Flächen-/Dosisverhalten des Aggr. Peak III
RSA / N₂O / Formiat / Vergleich von pH 8.2
mit pH 6.3

Versuchsreihe ohne Reduktion

-○- pH 8.2

--- pH 6.3

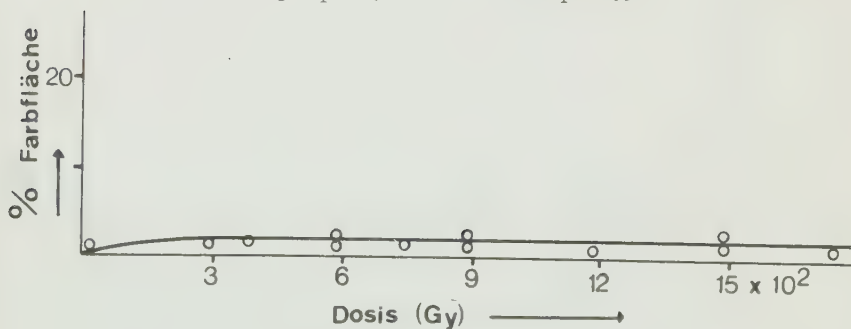


Abb. 26: Flächen-/Dosisverhalten des Frontpeaks

RSA / N₂O / Formiat / pH 8.2

Versuchsreihe mit Reduktion

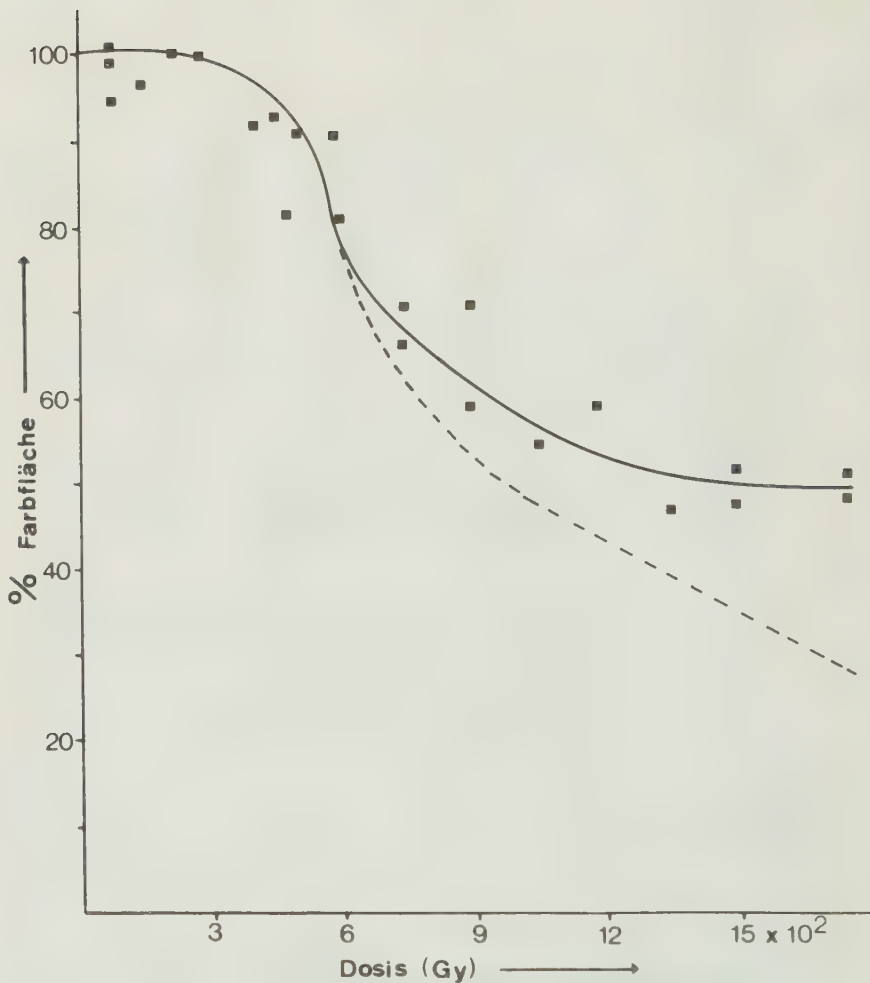


Abb. 27: Flächen-/Dosisverhalten des Hauptpeaks
 RSA / N₂O / Formiat / Vergleich von pH 8.2
 mit pH 6.3

Versuchsreihe mit Reduktion

- ■ - pH 8.2 - - - pH 6.3

bei pH 6.3 ab. Im restlichen Dosisbereich zeigt sich der langsamere Abbau des Hauptpeaks bei pH 8.2 im Vergleich zu pH 6.3. Damit entspricht das Bild weitgehend dem Verhalten des Hauptpeaks vor Reduktion (vgl. Abb. 24), lediglich um einen Dosisbetrag von etwa 600 Gy nach rechts verschoben. Interessanterweise läßt sich eine nahezu vollständige Übereinstimmung beider Kurven erzielen, wenn, nach Reduktion bei pH 8.2, die Fläche des sich separat ausbildenden Teilpeaks von der Gesamtfläche des Hauptpeaks subtrahiert wird.

Unterschiede im Flächenverhalten zeigen auch die Aggregatpeaks (Abb. 28 a-c). Man erkennt, wie schon nach Reduktion im Säuren, eine Verschiebung der ganzen Kurve in Richtung höhere Dosis und die Wiederholung der Ergebnisse bei pH 8.2 ohne Reduktion. Man findet also keinen Abbau des Aggregatpeaks I und II bei höherer Dosis auf Kosten eines kleineren Anstiegs im Aggregatpeak III.

Faßt man zusammen, so sieht man im alkalischen pH-Bereich eine geringere Strahlenempfindlichkeit des Hauptpeaks, verbunden mit einem anderen Verhalten der Aggregatpeaks bei höheren Dosen. Dies gilt für Versuchsbedingungen mit und ohne Reduktion. Als Besonderheit bildet sich bei höherer Dosis am Hauptpeak, nach Reduktion, ein Teilpeak heraus, dessen Zustandekommen noch näher diskutiert werden muß. Was die Reaktionsmechanismen, insbesondere die Rolle von Disulfidbrücken, betrifft, so gilt das schon bei pH 6.3 Gesagte auch für den alkalischen Bereich. Auch hier findet man zunächst eine schnelle Abbau-phase mit Ausbildung von Disulfidbrücken, gefolgt von Reaktionen, die sich nicht durch Reduktion rückgängig machen lassen.

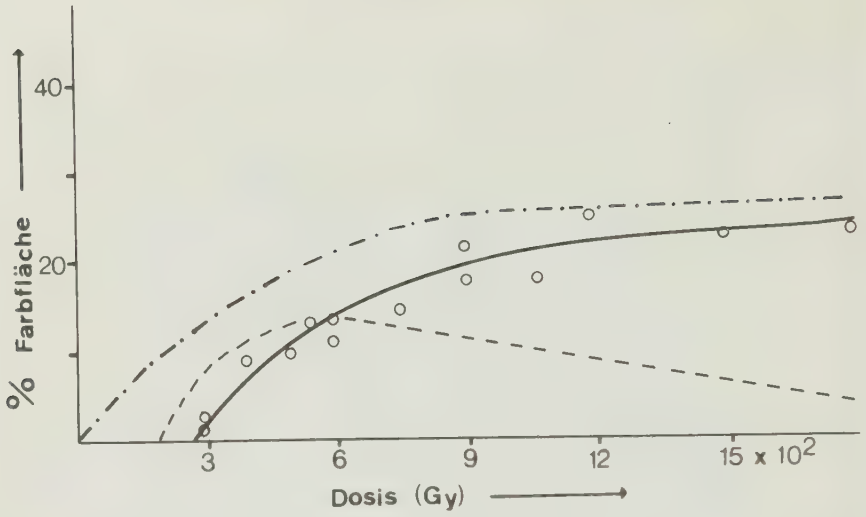


Abb. 28 (a): Flächen-/Dosisverhalten des Aggr.-Peak I

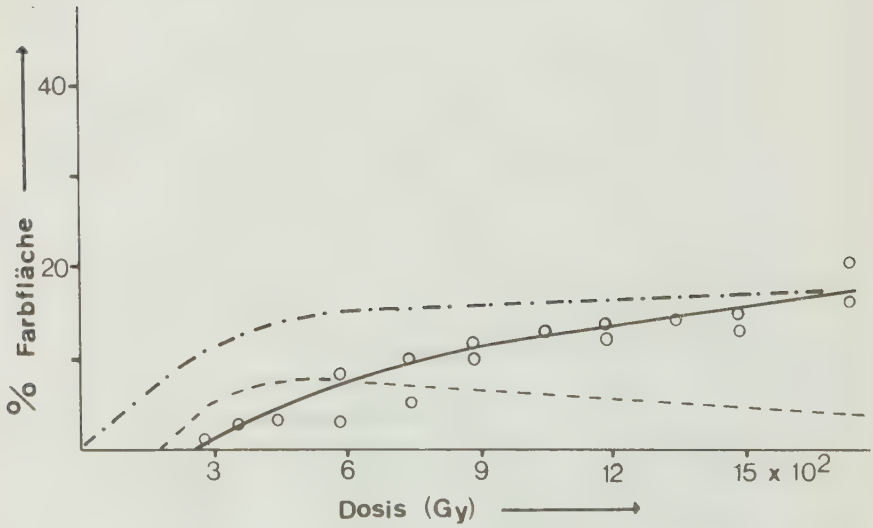


Abb. 28 (b): Flächen-/Dosisverhalten des Aggr.-Peak II

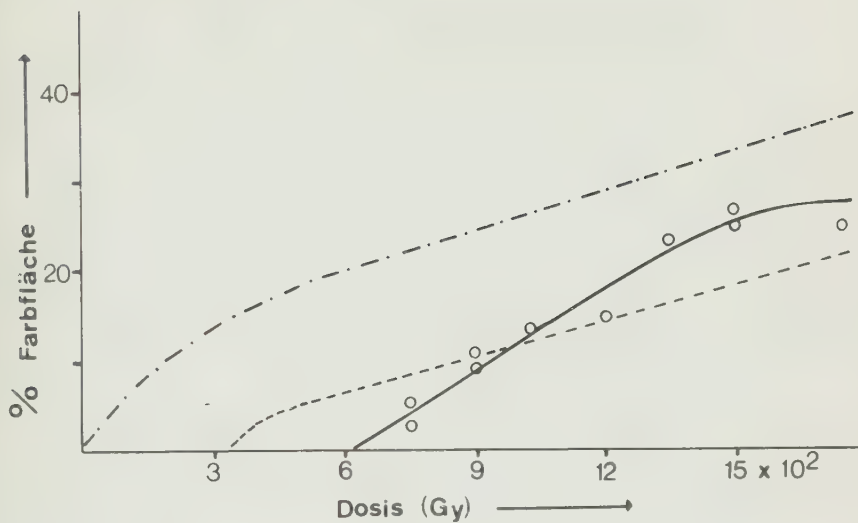


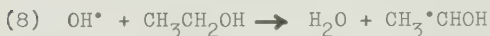
Abb. 28 (c): Flächen-/Dosisverhalten des Aggr.-Peak III
RSA / N₂O / Formiat / Vergleich von
—○— pH 8.2 Versuchsreihe mit Reduktion
---- pH 6.3 Versuchsreihe mit Reduktion
-.-.- pH 8.2 Versuchsreihe ohne Reduktion

3.4. Bestrahlung von Serumalbumin unter N_2O -Gas mit Zusatz von Äthanol

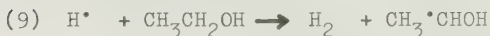
3.4.1. Radikale

Wie schon in der Einleitung erwähnt, eignet sich Äthanol, genauso wie Formiat, als Scavenger zum Abfangen von OH- und H-Radikalen.

Äthanol reagiert dabei nach folgenden Gleichungen:



$$k = 1.8 \times 10^9 \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$$



$$k = 3.9 \times 10^7 \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$$

Es stellt sich die Frage, ob ähnliche Reaktionen wie bei Formiat zu finden sind, oder ob das Äthanol-Radikal hiervon abweicht.

3.4.2. Bestrahlung bei pH 6.3

3.4.2.1. Deskriptive Auswertung der Elektropherogramme

Im Gegensatz zu den bisherigen Versuchen wurden die Bestrahlungen mit Äthanol bis zu einer Dosis von 5280 Gy durchgeführt, da in der Regel bei einer Dosis von 1760 Gy noch keine nennenswerten Veränderungen sichtbar waren.

Abbildung 29 zeigt die dazugehörigen Elektropherogramme. Man erkennt im Bereich bis 1760 Gy eine mäßig ausgeprägte Höhenabnahme des Hauptpeaks mit Ausbildung einer kleinen Schulter in Richtung Front. Ab dieser

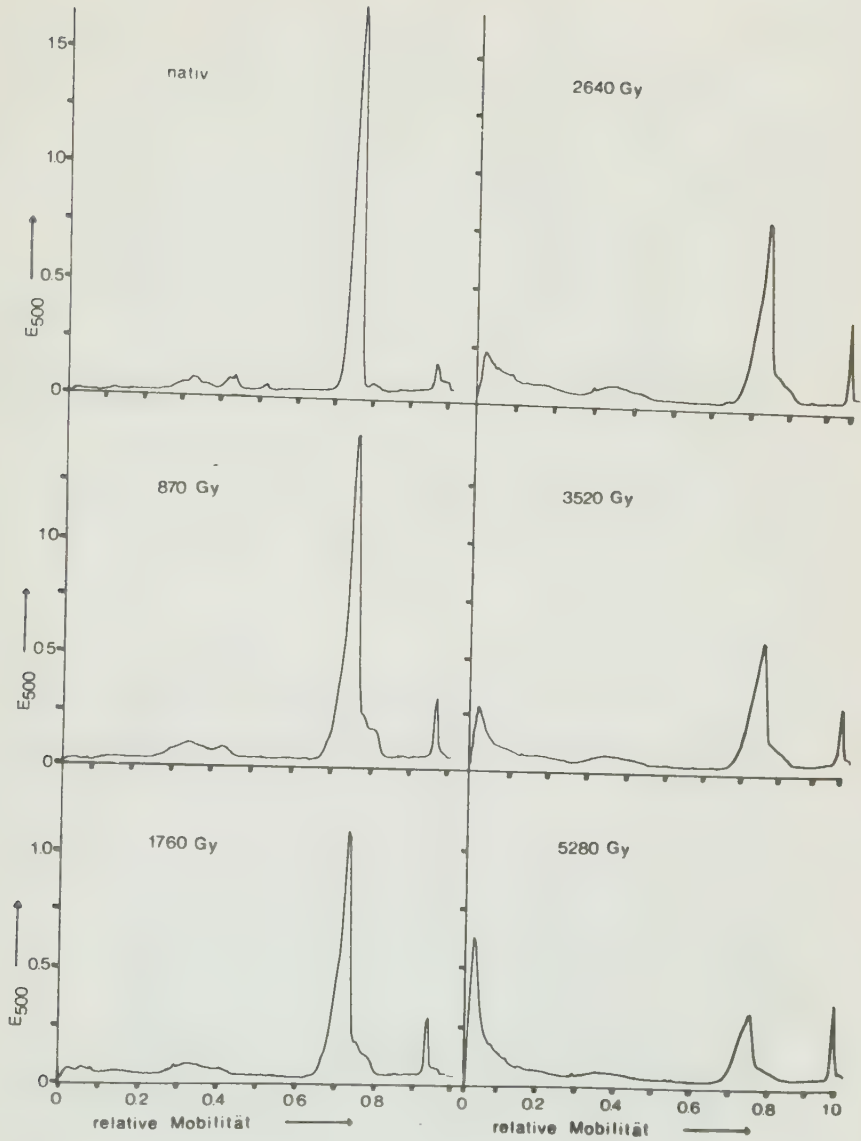


Abb. 29: Elektropherogramme RSA / N_2O / Äthanol / pH 6.3
Versuchsreihe ohne Reduktion

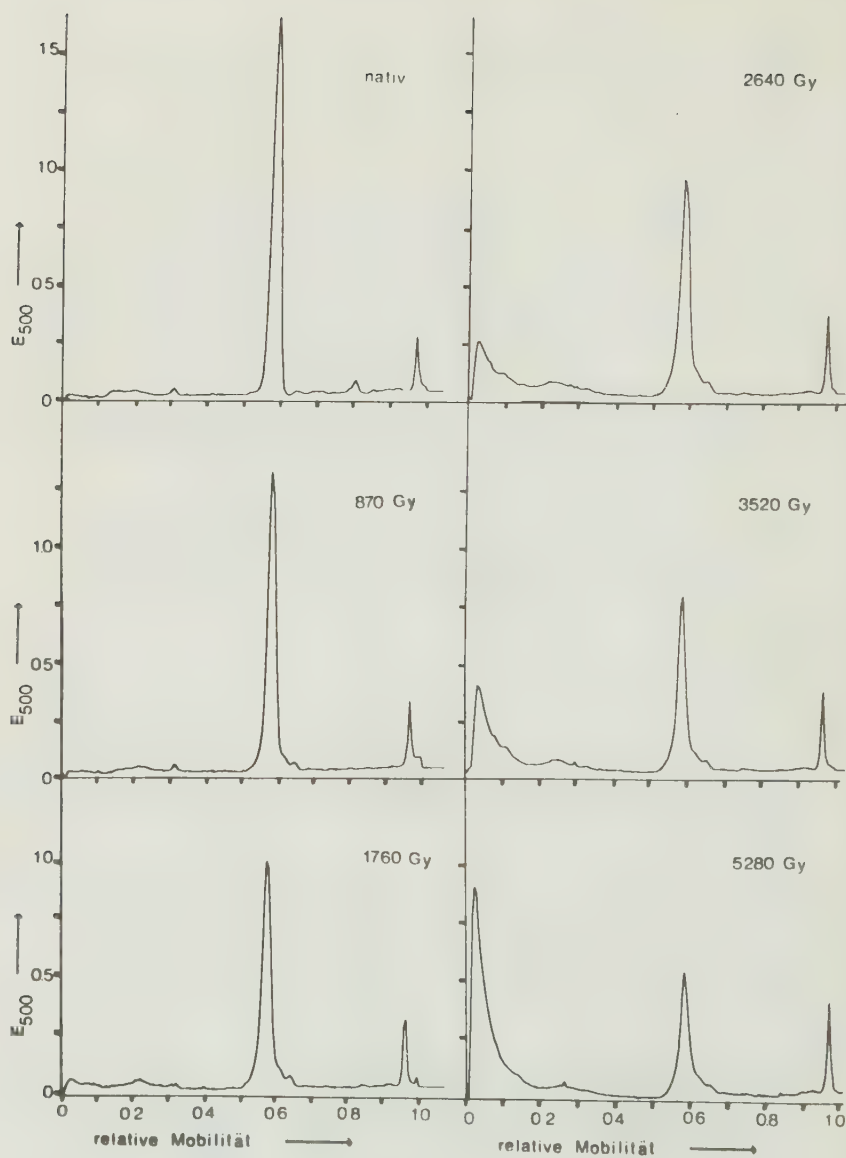


Abb. 30: Elektropherogramme RSA / N₂O / Äthanol / pH 6.3
Versuchsreihe mit Reduktion

Dosis ist auch die Entstehung von Aggregaten erkennbar, deren Dreierstruktur schwach, und auch erst im höheren Dosisbereich deutlich wird. Ein Frontpeak ist mit zunehmender Dosis nachweisbar. Vergleicht man die Form des Hauptpeaks mit derjenigen in der Formiat-Versuchsreihe vor Reduktion (Abb. 15), so bleibt hier die spitze, schlanke Form des Peaks erhalten, während bei Formiat die breite, abgerundete Form vorherrscht. Das Bild der Äthanol-Peaks erinnert schon vor Reduktion an das Bild, das bei Formiat erst nach Reduktion gefunden wird. Entsprechend unterscheiden sich die Kurven aus Abbildung 29 wenig von denen in Abbildung 30 für die Versuchsreihe mit Reduktion. Auch das Verhalten der übrigen Peaks läßt keinerlei größere Unterschied zwischen den beiden Bedingungen erkennen.

3.4.2.2. Flächen-/Dosiskurven

Diese bestätigen das identische Verhalten vor und nach Reduktion. Abbildung 31 zeigt die Zunahme der Frontpeakfläche mit steigender Dosis, wobei ein Anteil von 5 % an der Fläche des unbestrahlten Hauptpeaks nicht überschritten wird, wenngleich auch aufgrund des Elektropherogramms ein höherer Prozentsatz zu erwarten wäre. Abbildung 32 zeigt die Abnahme des Hauptpeaks mit und ohne Reduktion, ohne daß ein quantitativer Unterschied erkennbar wäre. Es muß dabei beachtet werden, daß bei allen Zeichnungen für Äthanol der Maßstab für die X-Achse um zwei Drittel verkleinert ist, um den gesamten Dosisbereich darauf abbilden zu können. Der Abfall der Kurve erscheint daher

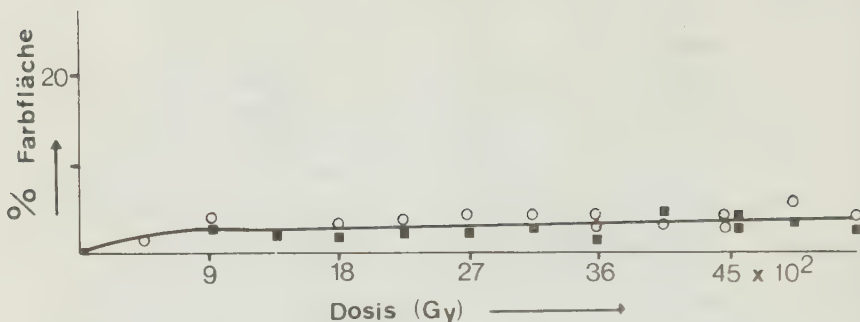


Abb. 31: Flächen-/Dosisverhalten des Frontpeaks
 RSA / N_2O / Äthanol / pH 6.3
 -○- Versuchsreihe ohne Reduktion
 -■- Versuchsreihe mit Reduktion

stärker ausgeprägt, als er im maßstabsgerechten Vergleich mit anderen Bedingungen (z.B. Formiat) wäre. Immerhin erreicht der Abbau des Hauptpeaks nach 5280 Gy 75 %, während bei Formiat schon nach etwa 1200 Gy, bei N_2O schon nach etwa 800 Gy eine derartige Prozentzahl an Molekülen verändert ist. Es darf daher nicht verwundern, daß auch die Aggregate erst bei sehr hohen Dosen flächenmäßig nachweisbar werden. Abbildung 33 a-c zeigt das Verhalten des Aggregatpeaks I. Man erkennt ein Maximum etwa bei 2700 Gy mit nachfolgendem, erneutem Abbau. Das Bild läßt sich vergleichen mit dem Verhalten des Aggregatpeaks I bei den Formiat-Versuchen (Abb. 19), lediglich ohne ein Divergieren vor und nach Reduktion. Auch fehlt bei Äthanol die für Formiat typische steile Anstiegsphase. Aggregatpeak II

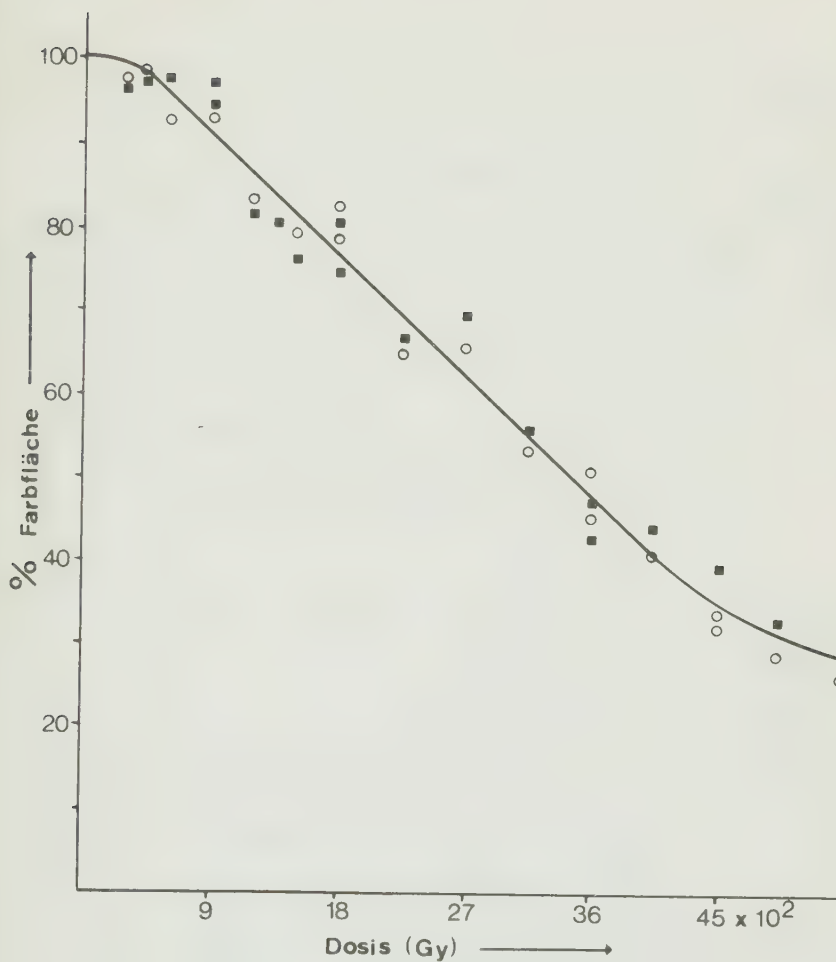


Abb. 32: Flächen-/Dosiskurve des Hauptpeaks
 RSA / N₂O / Äthanol / pH 6.3
 -○- Versuchsreihe ohne Reduktion
 -■- Versuchsreihe mit Reduktion

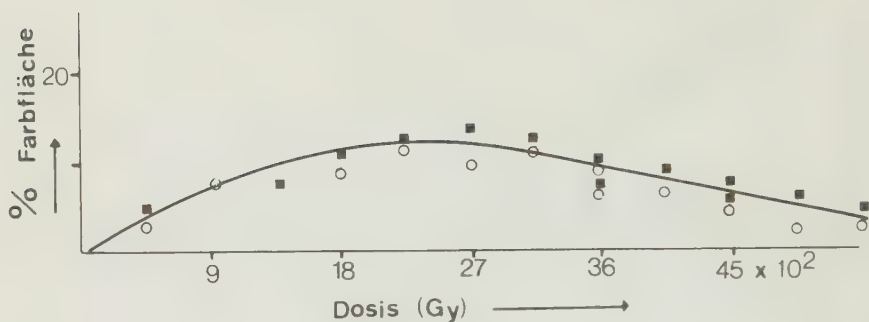


Abb. 33 (a): Flächen-/Dosisverhalten des Aggr.-Peak I
 RSA / N₂O / Äthanol / pH 6.3
 -○- Versuchsreihe ohne Reduktion
 -■- Versuchsreihe mit Reduktion

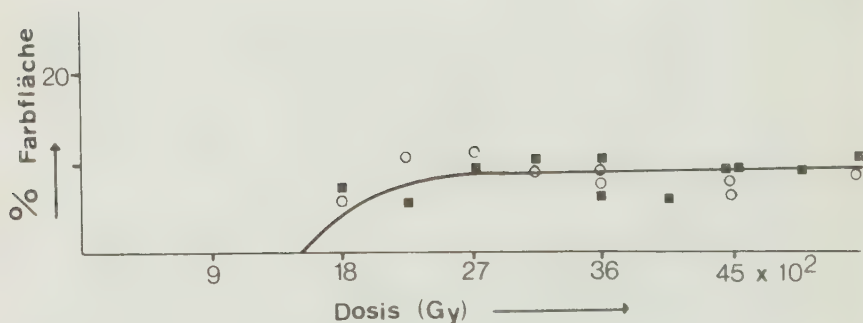


Abb. 33 (b): Flächen-/Dosisverhalten des Aggr.-Peak II
 RSA / N₂O / Äthanol / pH 6.3
 -○- Versuchsreihe ohne Reduktion
 -■- Versuchsreihe mit Reduktion

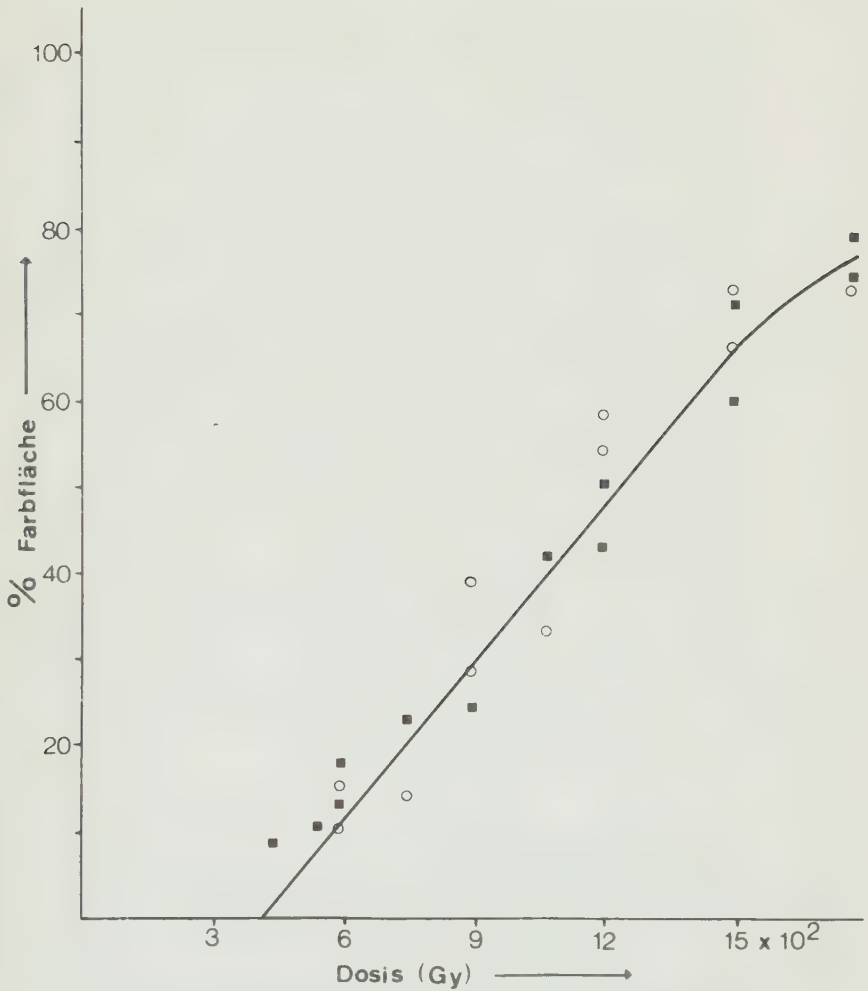


Abb. 33 (c): Flächen-/Dosisverhalten des Aggr.-Peak III
RSA / N_2O / Äthanol / pH 6.3
-○- Versuchsreihe ohne Reduktion
-■- Versuchsreihe mit Reduktion

zeichnet sich durch ein späteres Auftreten als Aggregatpeak I und eine Plateauphase ohne Abfall im höheren Dosisbereich aus. Das Bild wird ergänzt durch Aggregatpeak III, der etwa gleichzeitig mit Aggregatpeak II nachweisbar wird, der aber durch einen kontinuierlichen Anstieg charakterisiert ist.

Das dynamische Verhalten würde weitgehend dem bei den N_2O -Versuchen erstellten Konzept entsprechen. Demnach führen modifizierte Moleküle aus dem Hauptpeak zunächst zur Ausbildung des Aggregatpeak I, der auch als erster nachweisbar ist. Mit steigender Dosis entstehen höhermolekulare Aggregate im Aggregatpeak II und III. Dabei scheint in diesem Bereich im Aggregatpeak I der Abbau zu überwiegen (entsprechend einem Abfall der Kurve), während sich im Aggregatpeak II Abbau und Aufbau die Waage halten (= Plateau).

Auffälligstes Unterscheidungsmerkmal zu den Formiatversuchen ist das Fehlen spezifischer Reaktionen mit Ausbildung von Disulfidbrücken, die sich durch Reduktion nachweisen lassen.

3.4.3. Bestrahlung bei pH 8.2

3.4.3.1. Deskriptive Auswertung der Elektropherogramme

Abbildung 34 und 35 zeigen die Elektropherogramme für die Versuchsreihe bei pH 8.2. Man erkennt, im Vergleich zu den Kurven bei pH 6.3, für die Reihe

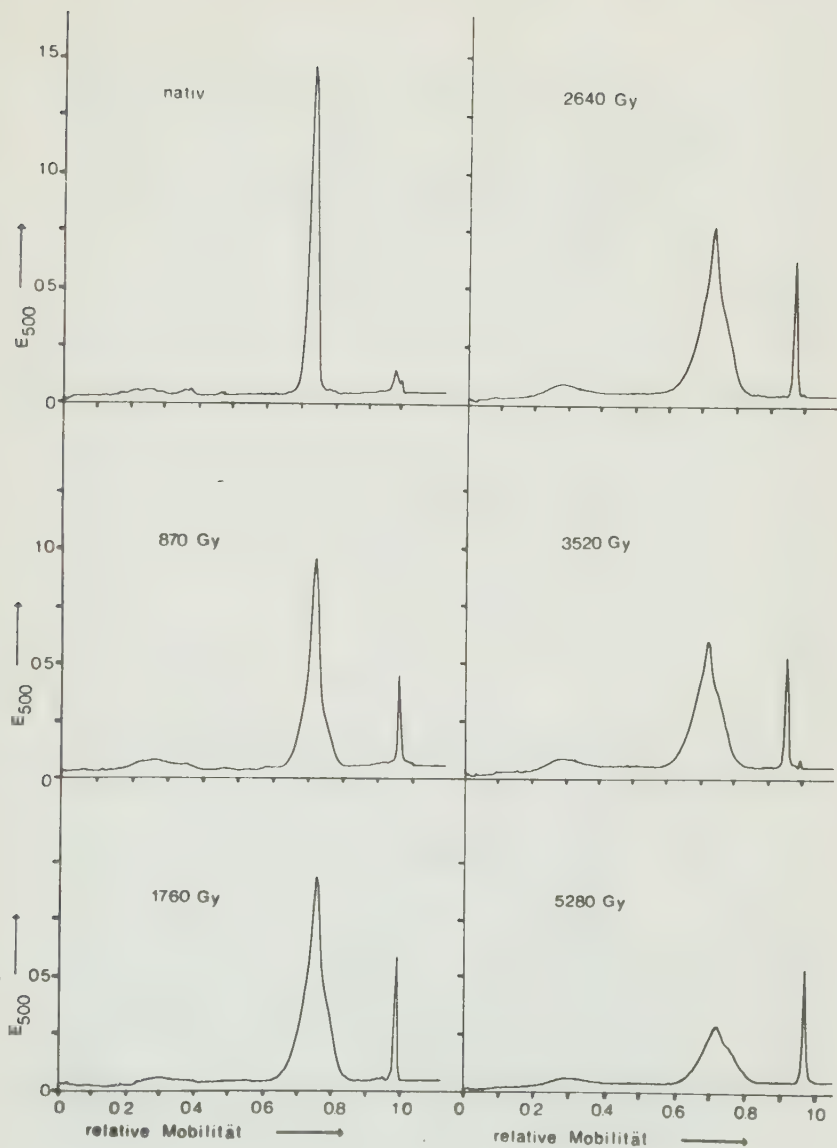


Abb. 34: Elektropherogramme RSA / N_2O / Äthanol / pH 8.2
Versuchsreihe ohne Reduktion

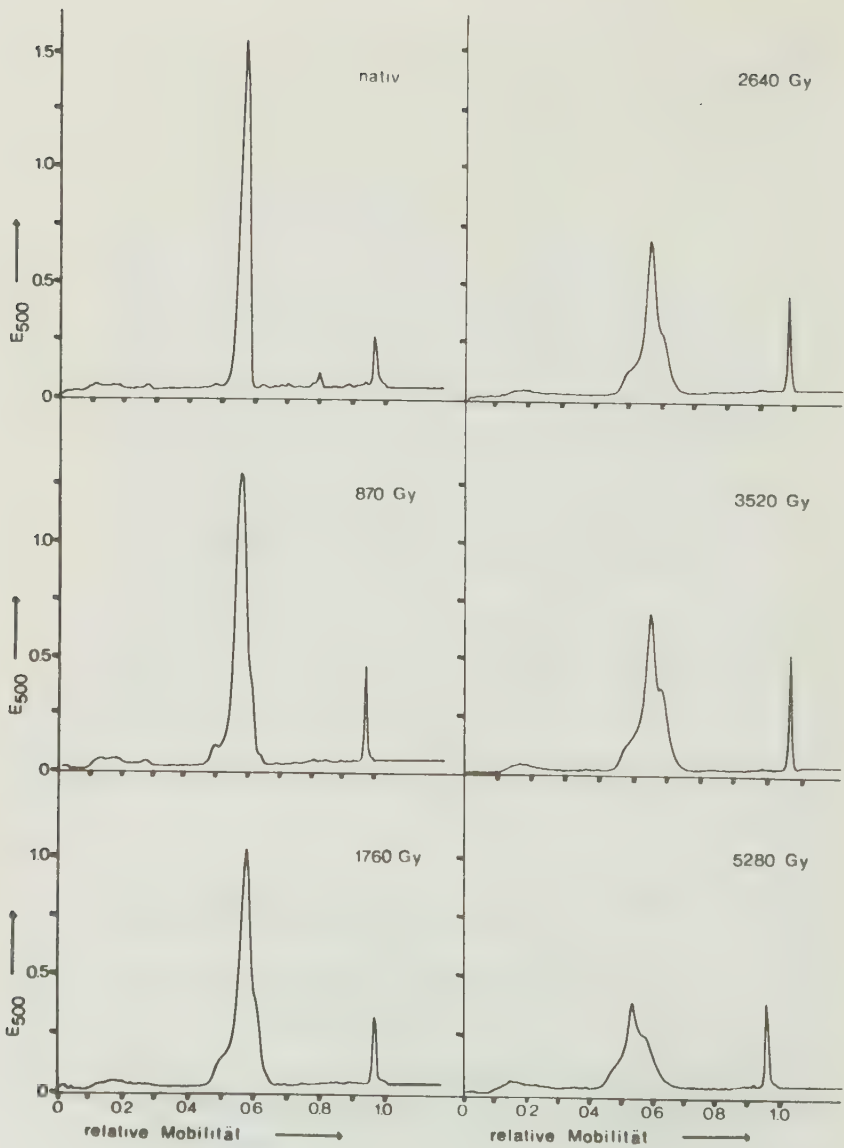


Abb. 35: Elektropherogramme RSA / N_2O / Äthanol / pH 8.2
Versuchsreihe mit Reduktion

ohne Reduktion eine fast ähnliche Höhenabnahme des Hauptpeaks, allerdings sind die Peaks insgesamt breiter und dafür ohne die kleine Schulter auf der Frontseite. Nach Reduktion ist schon früh die Ausbildung der Schultergruppierung links und rechts des eigentlichen Peaks erkennbar. In der 3520-Gy-Kurve ist fast ein Teilpeak sichtbar, ähnlich wie er bei den entsprechenden Bedingungen der Formiat-Versuche deutlich auftrat.

Ein Frontpeak ist bei den Versuchsbedingungen ohne und mit Reduktion nachweisbar.

Am auffälligsten ist jedoch das völlige Fehlen von Aggregatpeaks bei diesem pH-Wert. Rein qualitativ läßt sich ein Peak erkennen, der von seinem RF-Wert als Aggregatpeak I zu deuten wäre, doch gelingt es nicht, ihn quantitativ nachzuweisen.

3.4.3.2. Flächen-/Dosiskurven

Die quantitative Auswertung dieser Versuchsreihe beschränkt sich damit auf das Verhalten des Hauptpeaks. Abbildung 36 zeigt die entsprechende Kurve bei pH 8,2, im Vergleich zur Kurve bei pH 6,3. Man erkennt deutlich, daß der Abbau des Hauptpeaks sehr hohe Dosen erfordert, obwohl dieser, aufgrund der erreichten Maximalwerte im Elektropherogramm, in stärkerer Ausprägung erwartet werden könnte. Da die Hauptpeaks sich aber verbreitern, ist die Abnahme der Fläche relativ gering. Nach einer Dosis von 5280 Gy sind immerhin noch fast 75 % der Moleküle unverändert. Rechnet man diese Ergebnis mit der Größe der Frontpeaks zusammen, so liegt vermutlich hier die Erklärung für das Fehlen von Aggregatpeaks. Es sind

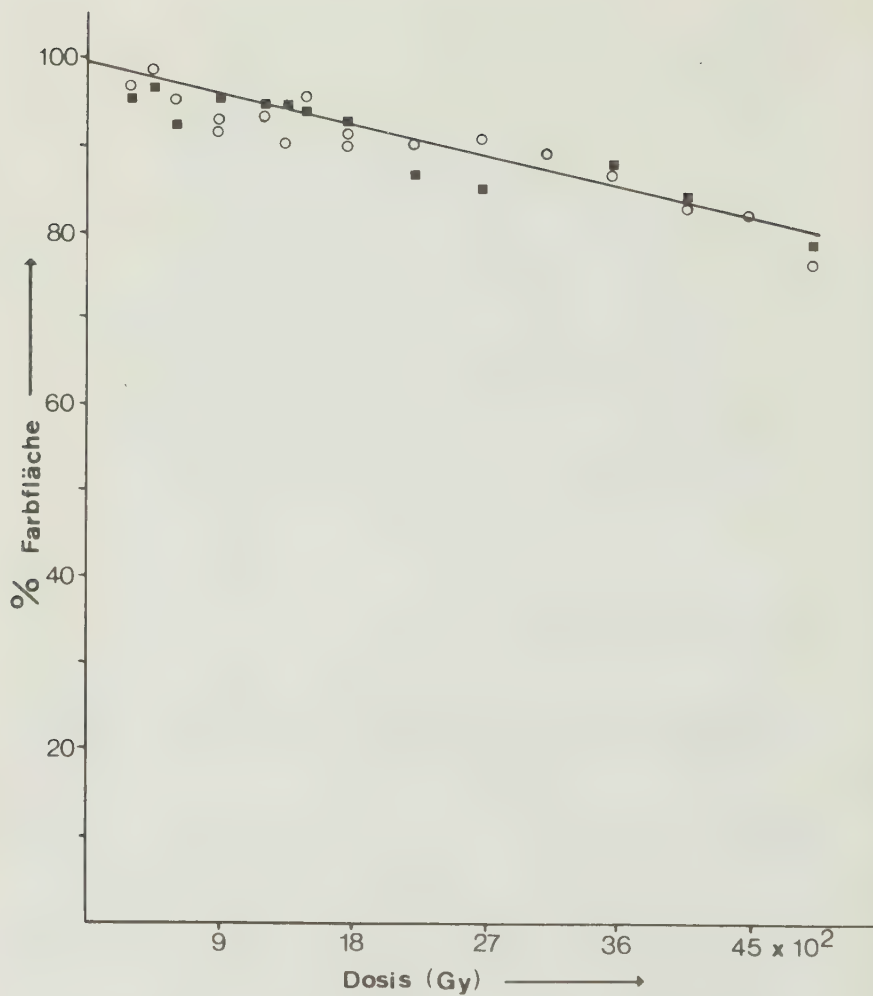


Abb. 36: Flächen-/Dosisverhalten des Hauptpeaks
RSA / N₂O / Äthanol / pH 8.2
-○- Versuchsreihe ohne Reduktion
-■- Versuchsreihe mit Reduktion

einfach noch zu wenige Moleküle von den Veränderungen betroffen, um Aggregate sicher nachzuweisen. Auch bei pH 8.2 stellt man keinen quantitativen Unterschied in der Abnahme des Hauptpeaks bei der Elektrophorese mit und ohne Reduktion fest.

3.5. Eichgeraden

Es wurden insgesamt vier Eichgeraden berechnet, mit deren Hilfe eine nähere Identifizierung der Peaks ermöglicht werden sollte.

Abbildung 37 zeigt die Eichgerade, die den Zusammenhang zwischen aufgetragener Proteinmenge und willkürlich gewählten Flächeneinheiten wiedergibt. Die zugehörige, gestrichelt gezeichnete, Regressionsgerade entspricht der Formel

$$y = 532,5 x + 263,8$$

Der Regressionskoeffizient r beträgt 0.994. Die durchgehend gezeichnete Eichgerade gilt für Proteine nach Reduktion:

$$y = 539 x + 133 ; r = 0.998$$

Man erkennt darin den linearen Zusammenhang zwischen Proteinmenge und Absorptionsfläche in einem Bereich zwischen 3 μ g und 30 μ g. Die für alle Versuche gleichbleibende Auftragsmenge von 15 μ g RSA liegt damit in einem optimalen Bereich.

Abbildung 38 und 39 für Proteine ohne und mit Reduktion verdeutlichen die Abhängigkeit der Wanderungsgeschwindigkeit vom Molekulargewicht und ermöglichen

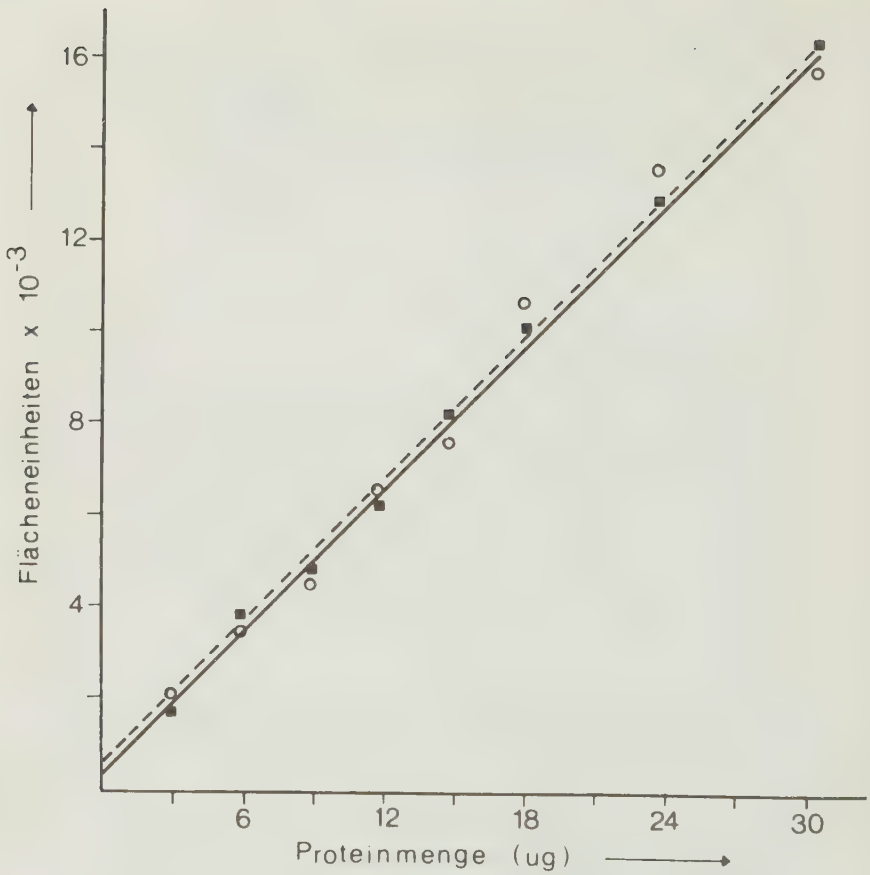


Abb. 37: Eichgerade für natives RSA; Abhängigkeit zwischen willkürlich gewählten Flächeneinheiten und der Proteinmenge

- Proteine ohne Reduktion
- Proteine mit Reduktion
- - - Eichgerade für Versuchsreihe ohne Red.
- Eichgerade für Versuchsreihe mit Red.

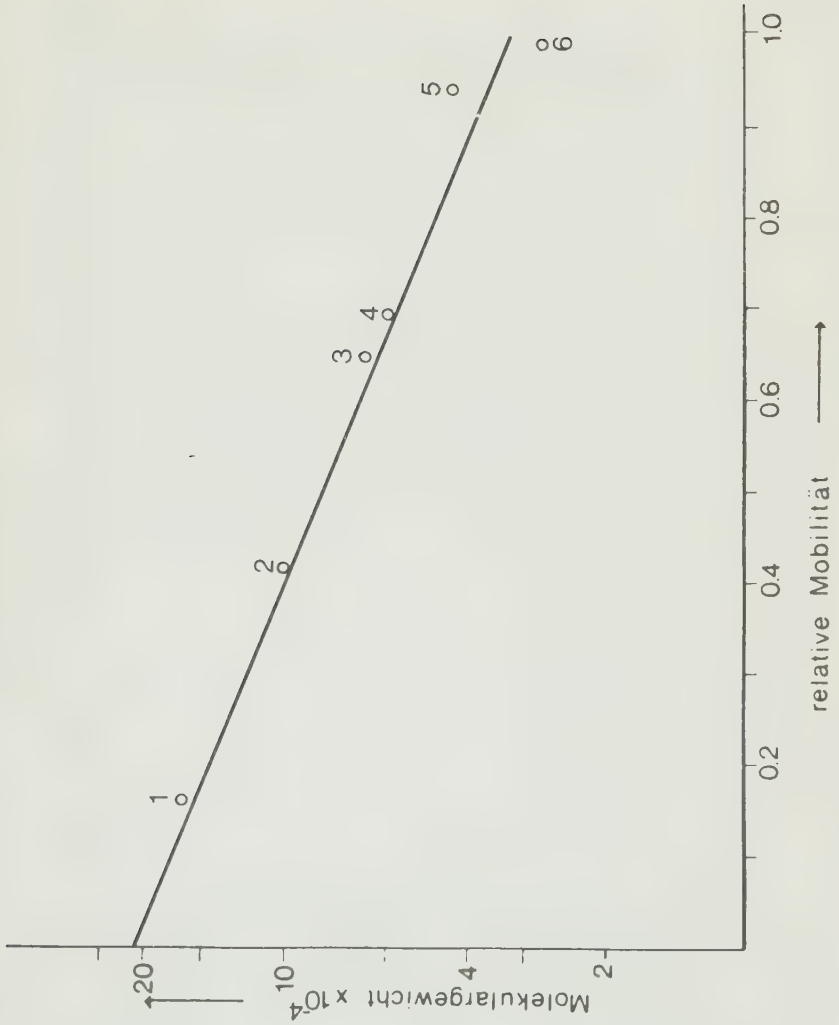


Abb. 38: Eichgerade zur Molekulargewichtsbestimmung
für Proteine ohne Reduktion
1=Gammaglobulin, 2=Phosphorylase A, 3=RSA,
4=Katalase, 5=Ovalbumin, 6=Chymotrypsinogen

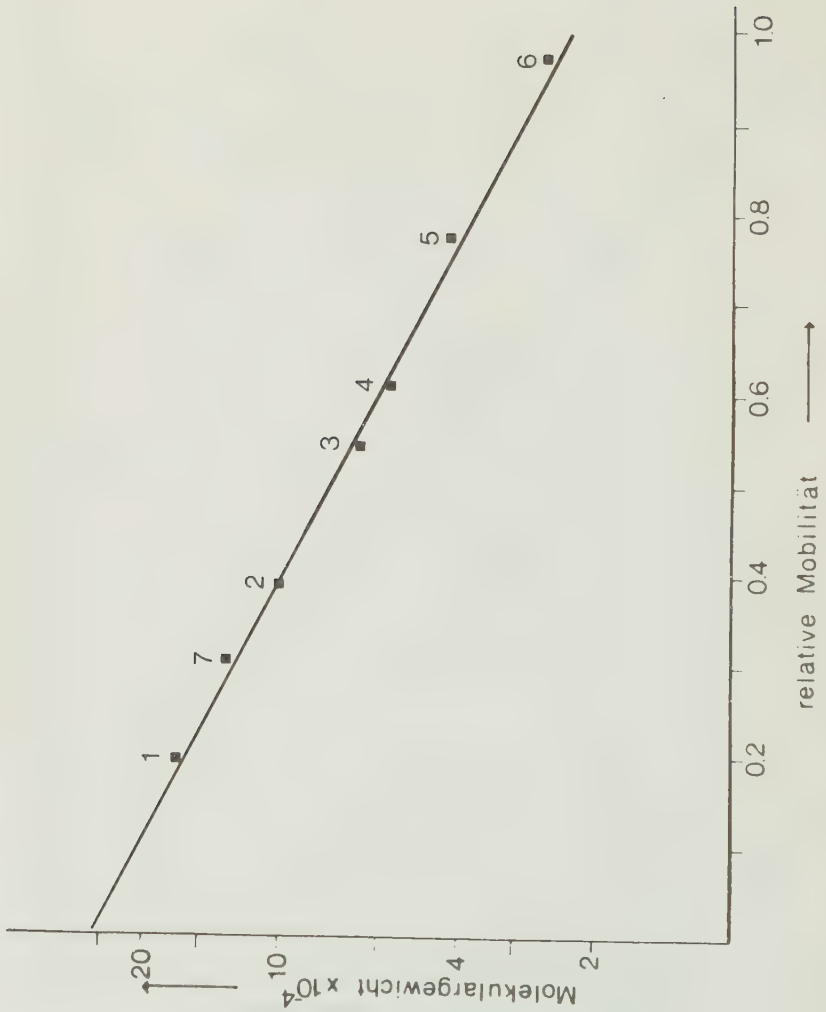


Abb. 39: Eichgerade zur Molekulargewichtsbestimmung
für Proteine nach Reduktion
1=Gammaglobulin, 2=Phosphorylase A, 3=RSA,
4=Katalase, 5=Ovalbumin, 6=Chymotrypsinogen,
7=Galactosidase

eine annähernde Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen in den Peaks bestrahlter Proben. Die Gleichungen lauten für Abbildung 38

$$y = 5.31 e^{-0.82 x}$$

bei einem Regressionskoeffizienten r von 0.993, und für die Abbildung 39

$$y = 5.41 e^{-1.03 x}$$

mit $r = 0.999$.

Neben diesen berechneten Eichgeraden liefen bei allen Versuchsbedingungen einige der Eichproteine mit, um eventuelle Abweichungen vom Wanderungsverhalten gegenüber der Eichgeraden festzustellen. Diese waren allerdings so gering, daß eine Gültigkeit der oben beschriebenen Eichgeraden für alle Bedingungen angenommen werden kann.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Einwirkung von OH- und organischen Radikalen auf das elektrophoretische Verhalten des Serumalbumins zu untersuchen. Die im vorangehenden Abschnitt dargestellten Ergebnisse erlauben verschiedene Ansatzpunkte zur Interpretation.

Einen ersten Schritt bilden Überlegungen zum methodischen Teil. Die Anwendung gleicher Meßmethoden und Versuchsbedingungen bei anderen Untersuchungen (S5, W1) ermöglicht es, diese Bemerkungen kurz zu fassen und auf die in diesen Arbeiten näher diskutierten theoretischen Grundlagen zu verweisen. Im weiteren sollen dann die Ergebnisse im Hinblick darauf diskutiert werden, wie sie mit den heutigen Kenntnissen über die Wirkmechanismen der einzelnen Radikale zu vereinbaren sind.

4.1. Methodische Grundlagen

Das Prinzip der Elektrophorese beruht auf der Trennung der Proteine aufgrund ihres Molekulargewichts und ihrer Ladung. Da nach Abschluß der Elektrophorese nicht unterschieden werden kann, welchen Einfluß die Ladung und welche Bedeutung das Molekulargewicht für das Trennergebnis hat, versucht man durch Ausschluß einer dieser Einflußgrößen, in erster Linie der Ladung des Proteins, die Trennung leichter interpretierbar zu machen. Dazu verwendet man Natriumdodecylsulfat (SDS), das sich reversibel über hydrophobe Wechselwirkung an das Protein bindet (R1). Die negativ geladenen

SDS-Moleküle bewirken über eine hohe Bindungsrate von ca. 1.4 g/g Protein (P2) bei reduzierten Proteinen eine negative Gesamtladung des Proteins, die den oben erwähnten Einfluß auf die Wandereigenschaften bei elektrophoretischer Trennung aufhebt, bzw. die Wanderrichtung der Proteine einheitlich in Richtung Anode lenkt.

Über die Form des entstehenden Protein-SDS-Komplexes herrschen unterschiedliche Vorstellungen (R2, C1, S4), denen aber allen eine asymmetrische Konformation, sowie die Zunahme der Längsachse mit steigendem Molekulargewicht, gemeinsam ist (W1).

Die Trennung von Proteinen mit dieser Methode erfolgt daher nur noch in Abhängigkeit vom Molekulargewicht.

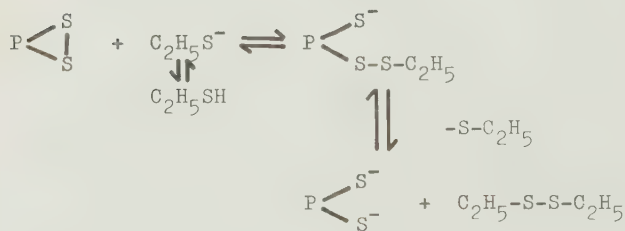
Der logarithmische Zusammenhang zwischen Molekulargewicht und Wandergeschwindigkeit im Gel (W2) ermöglicht über den Vergleich mit Eichproteinen bekannten Molekulargewichts eine nähere Charakterisierung der Trennprodukte.

Die Färbung der Proteine erfolgte mit dem Proteinfarbstoff Coomassie Brilliant Blue. Nach Fazekas de St. Groth (F1) läßt sich der Protein/Farbstoffkomplex, der über elektrostatische Wechselwirkung zwischen Farbstoff und Aminogruppen des Proteins reversibel stabilisiert wird, bei 549 nm photometrisch nachweisen. Der hohe Extinktionskoeffizient dieses Komplexes ermöglicht noch einen Nachweis von Proteinen im Mikrogrammbereich (W2).

Die photometrische Auswertung der Gele erfolgte auf der Grundlage des Lambert-Beerschen-Gesetzes, wobei sich die Gesamtextinktion als Summe der Extinktion des Proteins, des Gels, sowie der anderen Medien im Strahlengang (Küvettenglas, Wasser) ergibt.

Schilling (S5) beschreibt in seiner Arbeit die genauen Einzelheiten, die es ermöglichen, aus den gemessenen Extinktionen mit Hilfe eines Rechnerprogramms die Fläche eines Peaks zu berechnen. Winter (W1) gibt darüberhinaus eine Formel an, mit der die Proteinmenge direkt aus der Peakfläche berechnet werden kann, wobei die Proteinmenge der Peakfläche, bei gleichbleibendem Extinktionskoeffizienten, direkt proportional ist.

Die Reduktion der Proteine und Bestrahlungsprodukte wurde, wie beschrieben, mit Mercaptoäthanol durchgeführt, von dessen Verwendung man sich eine Klärung der Frage versprach, welche Rolle Disulfidbrücken bei der Stabilisierung von Aggregaten spielen. Für die Reduktion wird folgender Mechanismus angenommen:



4.2. Bestrahlung unter N₂O-Gas

Die bei der Bestrahlung von Serumalbumin unter N₂O-Gasatmosphäre entstehenden Radikale wurden bereits zu Beginn des Ergebnisteils erläutert. Die Hauptreaktion besteht in der Umwandlung der hydratisierten Elektronen in OH-Radikale (Gleichung 5). Die dabei ablaufenden Vorgänge können als kompetierende Radikal-Radikalreaktionen aufgefaßt werden, wobei als entscheidendes Kriterium die Frage nach der verbleibenden Reaktionswahrscheinlichkeit zwischen dem hydratisierten Elektron und dem Serumalbumin-Molekül besteht. Die Berechnung kann nach der bei Henglein (H1) angegebenen Formel erfolgen:

$$W_{\text{RSA} + e_{\text{aq}}^-} = \frac{k_{\text{RSA}+e_{\text{aq}}^-} \times [\text{RSA}]}{k_{\text{RSA}+e_{\text{aq}}^-} \times [\text{RSA}] + k_{\text{N}_2\text{O}+e_{\text{aq}}^-} \times [\text{N}_2\text{O}]}$$

Dabei bedeutet:

[RSA] = Konzentration des Rinderserumalbumins
= 1.5×10^{-5} Mol/l

[N₂O] = Konzentration des N₂O-Gases = 0.05 Mol/l (S1)

$k_{\text{RSA}+e_{\text{aq}}^-} = 6.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ bei pH 7.8 (S2)

$k_{\text{N}_2\text{O}+e_{\text{aq}}^-} = 8.7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ (S1)

Daraus ergibt sich:

$$\begin{aligned} W_{\text{RSA} + e_{\text{aq}}^-} &= \frac{6.5 \times 10^9 \times 1.5 \times 10^{-5}}{6.5 \times 10^9 \times 1.5 \times 10^{-5} + 8.7 \times 10^9 \times 0.05} \\ &= 0.0002 \end{aligned}$$

Das bedeutet, daß weit über 99 % der hydratisierten Elektronen mit N_2O reagieren und für eine Reaktion mit dem Serumalbumin nicht mehr zur Verfügung stehen. Entsprechend der äquimolaren Umwandlung der hydratisierten Elektronen in OH-Radikale verändern sich die G-Werte für die gebildeten Radikale:

$$G_{OH\cdot} = 5.35$$

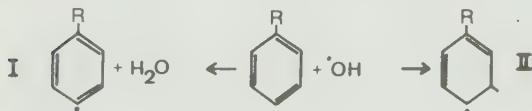
$$G_{H\cdot} = 0.58$$

Damit verschiebt sich das Verhältnis der beiden Radikale auf 9:1 zugunsten der OH-Radikale. Zahn (Z1) führte darüberhinaus die Geschwindigkeitskonstanten für die Reaktion der verbleibenden Primärradikale mit Puffer- und N_2O -Molekülen an, die in dieser Größenordnung keinen Einfluß auf die Wirksamkeit der Primärradikale haben dürften. Damit steht fest, daß die beschriebenen Veränderungen am Serumalbumin zum überwiegenden Teil auf den Einfluß der OH-Radikale zurückzuführen sind. Es interessiert daher die Frage, welche Eigenschaften das OH-Radikal besitzt, um Reaktionen auszulösen, die zu den beschriebenen Proteinmodifikationen führen können. Henglein (H1) gibt an, daß es sich bei dem OH-Radikal um ein reaktionsfreudiges Radikal mit vorwiegend oxidierender Wirkung handelt. Es besitzt die Fähigkeit, aus organischen Molekülen, deren C-H-Bindungen schwächer sind als entsprechende H-OH-Bindungen im Wasser, ein H-Atom zu entreißen und damit eine Radikalstelle, z.B. im Protein, zu erzeugen. Bevorzugtes Angriffsziel dieser H-Abstraktion ist das $C\alpha$ -Atom im organischen Molekül. Eine weitere Reaktionsmöglichkeit besteht in der Anlagerung des OH-Radikals an eine Doppelbindung in einem organischen Molekül.

Als Ansatzpunkte für eine Klärung der OH-Radikalwirkung bieten sich die Reaktionen mit einzelnen Aminosäuren, mit der Peptidbindung, sowie vergleichende Untersuchungen mit anderen Proteinen.

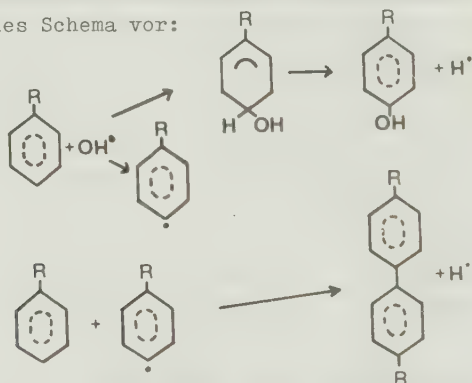
4.2.1. Reaktionen der OH-Radikale mit Aminosäuren

Yamamoto (Y1) versuchte durch Bestrahlung einzelner Aminosäuren Mechanismen für deren Aggregation untereinander oder deren Bindung an Serumalbumin zu finden. Nach seiner Meinung sind zwei Gruppen von Aminosäuren für strahleninduzierte Bindungen mit Proteinen oder Nukleinsäuren verantwortlich, zum einen aromatische (Phenylalanin, Tryptophen, Tyrosin, Histidin), zum anderen schwefelhaltige Aminosäuren (Methionin, Cystein, Cystin). Er fand eine starke Bindung von Phenylalanin, Tryptophan und Histidin an Serumalbumin, wenn er die Bestrahlung in einer N_2O -Atmosphäre ausführte. Den überwiegenden Einfluß der OH-Radikale bestätigte er durch eine verminderte Aminosäurebindung nach deren Abfangen. Aus Aggregationsuntersuchungen der Einzelaminosäuren, sowie aus Untersuchungen an Benzol und Benzolderivaten anderer Autoren, leitet er folgende zwei Reaktionswege für aromatische Aminosäuren ab:



I bezeichnet er als Phenyl-Radikaltyp,
II als Cyclohexadienyl-Radikaltyp.

Aufgrund seiner Beobachtungen über die Bindungsaktivität von Basen schließt er, daß beide Reaktionswege zwar möglich sind, daß aber lediglich Typ I aktiv an strahleninduzierten Bindungen teilnehmen kann. Bei der Folgereaktion mit Ausbildung eines Dimers handelt es sich, nach seiner Meinung, offensichtlich nicht um eine Radikal-Radikal-Reaktion, sondern um eine Substitutionsreaktion. Daher schlägt er für die Hydroxilierung und Dimerisierung von aromatischen Aminosäuren durch OH-Radikaleinfluß folgendes Schema vor:



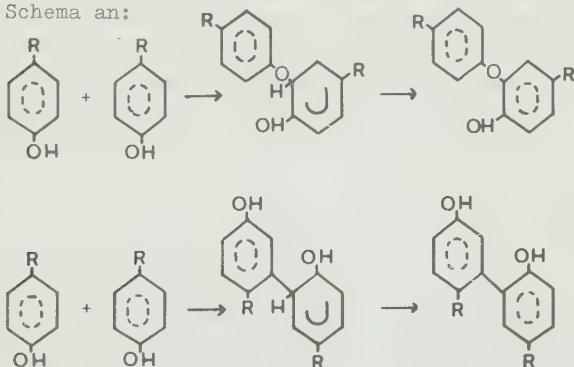
Der relativ hohe Gehalt aromatischer Aminosäuren im Serumalbumin läßt diesen Weg als Ansatz zur Erklärung der beobachteten Aggregationsvorgänge durchaus zu.

1975 veröffentlichte Yamamoto seine Untersuchungen (Y2) über das Bindungsverhalten der Aminosäure Tyrosin, der er, wegen ihrer Hydroxylgruppe am aromatischen Ring, ein komplizierteres Verhalten zuschreibt. Für Tyrosin, Dopa und Phenylalanin beobachtet er eine Abschwächung der strahleninduzierten Bindung an Serumalbumin im alkalischen pH-Bereich, in Abhängigkeit von der Zahl der OH-Gruppen am aromatischen Ring, was möglicherweise einen Hinweis auf

das unterschiedliche pH-Verhalten der Aggregate in dieser Arbeit gibt.

Yamamoto schließt aus den verschiedenen Beobachtungen beim Abfangen der Radikale, daß neben dem, für nicht-substituierte aromatische Aminosäuren postulierten Phenyl-Radikaltyp, der unter OH-Radikaleinfluß entsteht, ein zweiter, Phenoxyl-Radikaltyp, angenommen werden muß, der unabhängig vom OH-Radikaleinfluß und auch unabhängig von der Einwirkung hydratisierter Elektronen entsteht.

Die dabei auftretenden Bindungsmöglichkeiten, im Hinblick auf Aggregation, gibt er in folgendem Schema an:



Boguta und Dancewicz (B1) untersuchten ebenfalls das strahleninduzierte Bindungsverhalten von Tyrosin, alleine und als Dipeptid zusammen mit Glycin. Dabei konnten sie unter N_2O -Bedingungen Tyrosin-Dimere sicher nachweisen. Gleichzeitig fanden sie ein noch schwereres Bestrahlungsprodukt, das den Verdacht auf ein Tyrosin-Trimeres nicht ausschließt. Sie bestätigten wiederum durch Abfangen der OH-Radikale mit Methanol deren Einfluß auf die strahleninduzierten Bindungen des Tyrosins, ohne jedoch

eventuelle Zusatzreaktionen des Methanol-Radikals zu berücksichtigen.

Bei Bestrahlung des Dipeptids finden Boguta und Dancewicz ebenfalls Dimere über Tyrosin-Bindungen, wenngleich nach ihren Angaben die Ausbeute unter N_2O fünfmal kleiner war als unter N_2 . Mit Hinweis auf bisher unveröffentlichte Ergebnisse bestätigen die Autoren den Nachweis der Dimerisierung auch für Polytyrosin und einige Proteine.

Damit ergibt sich ein weiterer Baustein bei der Klärung der Frage, ob Mechanismen für strahleninduzierte Bindungen einzelner Aminosäuren auch auf Polypeptide und schließlich Proteine angewendet werden können und dürfen.

Als Reaktionsmöglichkeit für Tyrosin-Radikale unter N_2O geben die Autoren folgende Wege an:



Der erste Weg würde zur Dimerisierung, der zweite zur Rückbildung führen. Die Autoren bestätigen damit den von Yamamoto vorgeschlagenen Phenyl-Radikaltyp, können jedoch keinen Nachweis für Phenoxyl-Radikale mit Ausbildung eines Diphenyl-Äthers finden. Interessant ist auch ihr Hinweis, daß sie so gut wie keinen Angriff der Radiolyseprodukte auf die Peptidbindung des untersuchten Dipeptids finden.

Diese Beobachtungen bestätigen auch Jakubick und Delincée (J1), die sich mit der Frage beschäftigten, ob die strahleninduzierte Aggregation auf spezifische Reaktionsstellen oder auf eine zufällige

Verteilung der Bindungsstellen im Protein zurückzuführen ist. Ihre Untersuchungen über das Bindungsverhalten radioaktiv markierter Aminosäuren bestätigte, daß für die Aggregatbildung vornehmlich die aromatischen und schwefelhaltigen Aminosäuren verantwortlich sind. Mit ihren Ergebnissen über das Bindungsverhalten des Tryptophans schließen sie sich ebenfalls der Meinung Yamamotos an, daß sowohl interwie intramolekulare Aggregation kein zufälliger Prozeß, sondern spezifisch an das Reaktionsverhalten einiger Aminosäuren gebunden ist.

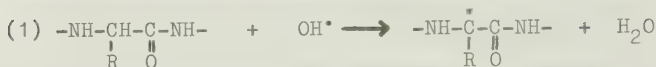
Einschränkend muß allerdings betont werden, daß die verwendete Untersuchungsmethode (Einschluß der Lösung in eine Glasampulle in Gegenwart von Luft) einen Einfluß von Sauerstoff in der Anfangsphase der Bestrahlung nicht ausschließt.

4.2.2. Reaktionen der OH-Radikale mit der Peptid-Bindung

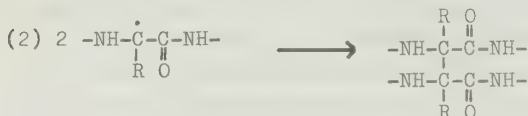
Die Reaktionsgeschwindigkeit der Peptidbindung mit den OH-Radikalen wird von Simic et al. (S3) mit $4.2 \text{ bzw. } 4.6 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ für Acetylglycin und Acetylalanin angegeben. Sie liegt damit um den Faktor 10 niedriger als die Konstanten, die für die Reaktion mit Aminosäuren gefunden werden ($3-9 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$) (S1). Schüßler (S1) nimmt an, daß unter der Voraussetzung gleicher Konstanten im Protein, dieser Unterschied durch die höhere Konzentration an Peptidbindungen ausgeglichen wird.

Garrison (G1) und Liebster/Kopoldová (L1) beschreiben einen Reaktionsmechanismus der OH-Radikale mit der Peptidbindung. Der erste Schritt besteht in

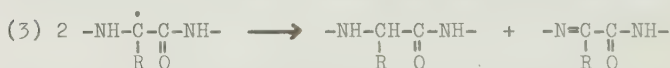
der erwähnten Abstraktion eines H-Atoms:



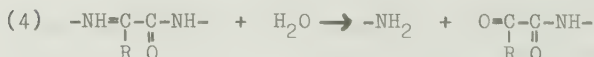
Bei Abwesenheit von Sauerstoff reagieren diese Radikale zum überwiegenden Teil unter Dimerisierung:



Daneben besteht die Möglichkeit zur Disproportionierung, eine Reaktion, die zum Bruch der Peptidkette führt, und die bei Anwendung auf Proteine die Entstehung von Bruchstücken erklären könnte:



Das dabei entstehende Dehydropeptid zerfällt in ein Amid und ein Diketon:



Garrison liefert mit diesem Mechanismus eine relativ gute Erklärung für die beobachteten Aggregationsphänomene, zumal die dem Frontpeak zugeschriebenen Bruchstücke ebenfalls erfaßt werden könnten.

Der Angriff auf die Peptidbindung darf sicherlich als eine zufällig verteilte Reaktion aufgefaßt werden, wenngleich auch die Proteinoberfläche bei den Anfangsreaktionen bevorzugt wird. Im Hinblick auf die Molekülkonfiguration des entstehenden Dimers

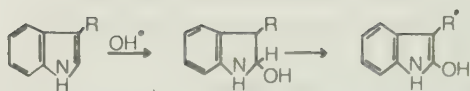
sind, je nach Lage der miteinander reagierenden Radikalstellen, beliebige Kombinationen denkbar. Damit bietet sich auch eine Erklärung für die erwähnten Verbreiterungen, besonders bei den Aggregat-peaks. Geringfügige Wanderungsunterschiede der Molekülkombinationen, verbunden mit Ladungsdifferenzen durch variierende Mengen gebundenen SDS, sind als weitere Ursachen möglich.

Der Mechanismus von Garrison, der vielfältige Aggregatkombinationen zuläßt, stellt damit einen gewissen Gegensatz zu den bisher aufgeführten Untersuchungen dar, deren Autoren die Aggregatentstehung spezifischen Radikalstellen im Protein zuschrieben.

4.2.3. Reaktionen der OH-Radikale mit Proteinen

Ausgehend von Untersuchungen über den OH-Einfluß auf strahleninduzierte Veränderungen an einzelnen Aminosäuren und der Peptidbindung, stellt sich die Frage, ob Aggregationsphänomene auch an Proteinen, ähnlich wie in dieser Arbeit, beobachtet werden konnten.

Bisher wurden bereits mehrere Proteine daraufhin untersucht. Aldrich und Mitarbeiter (A4) sowie Adams (A3) beschäftigten sich mit der strahleninduzierten Inaktivierung von Lysozym. Beide konnten einen bevorzugten Angriff der OH-Radikale auf die Aminosäure Tryptophan im Protein nachweisen. Der von ihnen beschriebene Mechanismus entspricht der Anlagerung des OH-Radikals an den Indolring mit Ausbildung einer Radikalstelle.



Adams und Mitarbeiter (A1) führten diese Untersuchungen an Ribonuklease weiter, die kein Tryptophan enthält. Er bestätigte den Angriff der OH-Radikale auf aromatische und heterozyklische Aminosäuren, wobei er als Mechanismus ebenfalls die OH-Anlagerung an das Ringsystem mit Ausbildung eines Hydroxyhexadienyl-Radikals annimmt.

Mee und Adelstein (M1) konnten über Gelfiltration die Entstehung von Ribonuklease-Aggregaten unter OH-Einfluß zeigen. Durch Molekulargewichtsbestimmung gelang ihnen der Nachweis, daß es sich bei den Aggregaten um dimere und trimere Verbindungen der nativen Ribonuklease handelt. Absorptionsuntersuchungen der eluierten Peaks zeigten, in Abhängigkeit von der Dosis, ein nahezu identisches Verhalten, verglichen mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Mee und Adelstein beobachteten einen starken Abfall des Nativpeaks, verbunden mit dem Anstieg aller Aggregatpeaks im niedrigen, sowie einem Abfall niedermolekularer und weiterem Anstieg hochmolekularer Aggregate im oberen Dosisbereich (siehe auch 4.4.). Die Aminosäureanalysen ihrer Bestrahlungsprodukte zeigen den bevorzugten Abbau von Cystin, Methionin, Tyrosin und Phenylalanin.

Schüßler (S1) kann in ihren Untersuchungen an Ribonuklease zusätzlich zu diesen Aminosäuren den Abbau von Histidin und Lysin nachweisen und begründet den fehlenden Abbau basischer Aminosäuren bei Mee und Adelstein mit der Besonderheit der von ihnen benutzten Methode zur Aminosäureanalyse.

Über die Messung der Streulichtintensität und mit Hilfe der Gelelektrophorese gelang Hashimoto und Mitarbeitern (H4) der Nachweis von Lysozym-Dimeren unter OH-Einfluß. Ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit erlaubt ihnen die Verwendung von SDS und Mercaptoäthanol den Nachweis kovalenter, nicht disulfidbrückenbedingter Bindungen zur Stabilisierung des Dimers. Als Mechanismus für die Dimerbildung führen sie ebenfalls den von Adams beschriebenen Angriff der OH-Radikale auf die Tryptophanreste in dem Protein an. Damit deckt sich ihre Meinung mit dem von Yamamoto vorgestellten, oben beschriebenen Mechanismus. Hashimoto et al. schätzen, daß beim Angriff der OH-Radikale auf die Oberfläche des Lysozyms etwa 50 % der Radikale mit den aromatischen Aminosäureresten reagieren, wobei davon wieder 60 % die Tryptophan-Reste angreifen. Allerdings schließen sie neben diesem Vorgang eine Reaktion mit aliphatischen Seitenketten nicht aus.

Faßt man diese Beobachtungen zusammen, so läßt sich feststellen, daß die Aggregation von Aminosäuren und Proteinen, unter dem Einfluß von OH-Radikalen, eines der wichtigsten Ergebnisse dieser Autoren darstellt. Es wurden verschiedene Mechanismen vorgestellt, wie sich das Zustandekommen von Aggregaten erklären läßt. Die beobachteten Reaktionen einzelner Aminosäuren können auch auf Proteine übertragen werden. Schwefelhaltige und aromatische Aminosäuren erweisen sich als bevorzugtes Angriffsziel der OH-Radikale und sind damit als spezifische Stellen im Protein für die Aggregation verantwortlich. Daneben erlaubt der Mechanismus von Garrison die Annahme unspezifischer Radikalstellen an den Peptidbindungen des Proteins. Beide Mechanismen sind auf die Ergebnisse dieser

Arbeit anwendbar. So sprechen die schlanke, spitze Form der Hauptpeaks während der gesamten Bestrahlungsdauer eher für spezifische Radikalstellen im Protein, die bevorzugt intermolekulare Radikal-Radikal-Reaktionen zustande kommen lassen, während die breite, abgeflachte Form der Aggregatpeaks und die Bruchstücke diesen Mechanismus zwar nicht ausschließen, aber doch eher an einen unspezifischen Angriff auf die Peptidbindung denken lassen.

Ein Angriff von OH-Radikalen auf schwefelhaltige Aminosäuren mit Ausbildung von reduzierbaren Disulfidbrücken läßt sich nur qualitativ an einer geringfügigen Basisverbreiterung der Peaks in der Versuchsreihe ohne Reduktion, und der Entstehung einer Schulter in Richtung Front, als mögliche Folge intramolekularer Quervernetzung, zeigen. Der fehlende Nachweis bei der quantitativen Flächenauswertung macht aber deutlich, daß dieser Reaktion nicht die Bedeutung zukommt, wie es bei anderen Versuchsbedingungen (z.B. Formiat) ersichtlich wird.

Auf das Verhalten der Aggregatpeaks im Verlauf der Bestrahlung, sowie auf die Abhängigkeit der Ergebnisse vom pH-Wert, soll im Punkt 4.4 nochmals näher eingegangen werden.

4.3. Bestrahlung in Gegenwart von organischen Radikalen

Wie mehrfach beschrieben, eignen sich organische Radikale zum Abfangen von Primärradikalen. Ihre Verwendung bestand ursprünglich zum einen darin, einen Schutzeffekt vor den Einwirkungen der Primärradikale zu erzielen, zum anderen, einzelne Primärradikale selektiv abzufangen, um die Wirkung der verbleibenden getrennt beobachten zu können. Diese Ansicht muß dahin revidiert werden, daß bei der Reaktion zwischen Primärradikalen und Radikalfängern diese selbst radikalische Eigenschaften erhalten und mit den Proteinen reagieren können. Formiat und Äthanol sind zwei dieser organischen Radikale, die in der Lage sind, Primärradikale abzufangen. Die dazugehörigen Reaktionsgleichungen (6) und (7), bzw. (8) und (9), sind jeweils zu Beginn des entsprechenden Ergebnisteils aufgeführt. Für die in dieser Arbeit vorliegenden Versuchsbedingungen (N_2O -Gas, 10^{-1} M Radikalfänger) gibt Schüßler (S6) folgende G-Werte an:

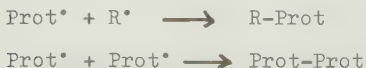
Bedingung	e^-_{aq}	$\text{OH}^\bullet$	$\text{H}^\bullet$	$\text{R}^\bullet$
N_2O	--	5.4	0.6	--
$\text{N}_2\text{O} + 10^{-1}\text{M Äth.}$	--	--	0.2	5.8
$\text{N}_2\text{O} + 10^{-1}\text{M Form.}$	--	--	--	6.0

Damit können die beobachteten Veränderungen bei den Formiatversuchen mit einiger Sicherheit auf alleinige Einwirkungen dieses Radikals zurückgeführt werden, während bei den Äthanolversuchen noch ein geringer Anteil an H-Radikalwirkung zu berücksichtigen ist.

Äthanol- und Formiatradikale besitzen reduzierende Eigenschaften. Entgegen dem von Lillie et al. (L2) angegebenen Redoxpotential von $E_0 = -1.03$ V zeigen neuere Messungen von Breitenkamp (B3), daß das Redoxpotential für das System $\text{CO}_2/\text{CO}_2^-$ bei $E_0 = -2.0$ V anzusetzen ist. Damit liegt es wesentlich näher an dem Wert des hydratisierten Elektrons, der mit $E_0 = -2.60$ V nach Henglein (H1), bzw. $E_0 = -2.90$ V nach Swallow (zit. nach Schüßler (S9)) angegeben wird. Das Redoxpotential des Systems $\text{CH}_3\text{CHO}/\text{CH}_3\text{CHO}^-$ ist pH-abhängig, wie Breitenkamp (B3) und Mitarbeiter in ihren Messungen ebenfalls zeigen konnten. Demnach liegt E_0 bei -1.8 V, gemessen am pK-Wert von 11.6, während sich, auf pH 7.0 umgerechnet, der Wert von $E_0 = -1.1$ V ergibt. Bezogen auf die pH-Verhältnisse in dieser Arbeit kann angenommen werden, daß das Redoxpotential des Äthanolradikals zwar um den Wert von -1.1 V schwankt (bei pH 8.2 liegt er bei ca. -1.3 V), es sich aber trotzdem deutlich von dem des Formiatradikals unterscheidet. Aufgrund dieser Eigenschaften können organische Radikale folgendermaßen mit Proteinen reagieren (S6):

- 1) Elektronenübertragung $\text{R}^\bullet + \text{Prot} \longrightarrow \text{Prot}^\bullet + \text{R}$
- 2) H-Abstraktion $\text{R}^\bullet + \text{Prot-H} \longrightarrow \text{Prot}^\bullet + \text{RH}$

Diese Reaktionen bieten die Voraussetzung für mögliche Quervernetzungen:



Die Versuchsergebnisse mit Formiat lassen einen starken, pH-abhängigen Abbau der Proteinmoleküle in einem Dosisbereich bis etwa 600 Gy erkennen.

Die Rückbildungsfähigkeit durch Reduktion der Disulfidgruppen läßt vermuten, daß dieser Reaktionsmechanismus zunächst spezifisch über die Bildung von S-S-Radikalen zur Aggregation und damit zum Abbau der Proteine im Hauptpeak führt.

Adams und Mitarbeiter (A3) konnten beobachten, daß eine Elektronenübertragung vom Formiatradikal auf die Disulfidbrücken der Ribonuklease stattfindet und daß dieser Vorgang bei 420 nm mit Hilfe der Pulsradiolyse gemessen werden kann. Ausgehend von diesen Angaben baute Schüssler diese Meßmethode für die Untersuchung der organischen Radikale bei ihrer Einwirkung auf Ribonuklease und Rinderserumalbumin aus. Die Ergebnisse zeigen, daß Formiatradikale ihr Elektron mit einer Geschwindigkeitskonstanten von $k = 7 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ auf natives Serumalbumin bei pH 7.6 übertragen. Das entspricht, unter Berücksichtigung der Rückreaktion zweier Formiatradikale, einem Anteil von 50 % an Radikalen, die mit dem Protein reagieren können. Verfolgt man die Geschwindigkeitskonstante, nachdem das Protein vorbestrahlt wurde, so steigert sie sich etwa um den Faktor zwei. Die pulsradiolytische Messung der S-S-Radikalausbeute ergibt, daß bei pH 7.6 etwa 23 % der Formiat-Radikale, nach Vorbestrahlung mit ca. 200 Gy aber über 50 %, ihr Elektron auf die Disulfidgruppen des Serumalbumins übertragen können. Gleiche pulsradiolytische Messungen bei pH 6.4 ergeben eine noch größere Reaktionsgeschwindigkeit und erhöhen den Anteil der Formiatradikale, die spezifisch mit S-S-Brücken reagieren, nach Vorbestrahlung mit ca. 200 Gy, auf über 70 %.

Diese Ergebnisse können anhand eines Rechenbeispiels ergänzt werden. Bei Kenntnis der Dosis und des G-Werts

für die entstehenden Radikale läßt sich anhand der Flächen-/Dosiskurven der Hauptpeaks grob errechnen, wieviele Radikalmoleküle pro verändertem Proteinmolekül gebildet worden sind.

Dazu folgendes Beispiel:

Betrachtet werden soll die Versuchsreihe ohne Reduktion bei pH 6.3, sowohl für N_2O , wie auch für Formiat- und Äthanolzusatz. 20% des Hauptpeaks ($= 0.3 \times 10^{-8}$ Mol RSA /g) sind unter diesen Bedingungen nach folgenden Dosen abgebaut:

N_2O :	ca. 300 Gy	G: 6.0 ($= OH^\bullet + H^\bullet$)
Eth.:	ca. 1500 Gy	G: 5.8
For.:	ca. 30 Gy	G: 6.0

ferner gilt: $1 \text{ Gy} = 6.2 \times 10^{15} \frac{\text{eV}}{\text{g}}$, damit berechnet sich die Zahl der Radikale in Mol/g:

$$\frac{6.0 \times 6.2 \times 10^{15} \times 30}{100 \times 6.23 \times 10^{23}} = 1.8 \times 10^{-8} \text{ Mol/g Formiat}^\bullet$$

$$\text{bzw.} = 87 \times 10^{-8} \text{ Mol/g Äthanol}^\bullet$$

$$\text{bzw.} = 18 \times 10^{-8} \text{ Mol/g Prim.-Rad.}$$

Damit entfallen auf ein abgebautes RSA-Molekül:

6	Formiatradikale
290	Äthanolradikale
60	Primärradikale

Führt man diese Berechnung für einen RSA-Abbau von 75 % durch ($= 1.12 \times 10^{-8}$ Mol RSA/g), so erhält man folgende Werte:

For.:	1200 Gy	72×10^{-8} Mol/g	64 Form [•] /RSA
Eth.:	5280 Gy	306×10^{-8} Mol/g	272 Eth [•] /RSA
N_2O :	800 Gy	48×10^{-8} Mol/g	43 Prim.- Rad./RSA

Wenngleich diese Ergebnisse nur rechnerisch ermittelte Verhältnisse wiedergeben und Rückreaktionen der Radikale nicht berücksichtigen, so zeigt sich folgendes Bild:

- a) die Zahl gebildeter Radikale pro RSA-Molekül bleibt mit ca. 40-60 bei N_2O und ca. 270-290 bei Äthanol praktisch über den gesamten Dosisbereich konstant.
- b) bei Formiat findet man dagegen im Bereich bis etwa 300 Gy, das entspricht dem stärksten Abbau des Hauptpeaks, ein Verhältnis von ca. 6-10 erzeugter Formiatradikale pro RSA-Molekül. Mit Änderung des Kurvenverlaufs verschiebt sich aber die Zahl auf über 60. Es bestätigt sich im Anfangsbereich wiederum die hohe Spezifität der Formiatradikale, da nur wenige pro RSA-Molekül genügen, um diese anzubauen. Im höheren Dosisbereich läßt die hohe Zahl an Radikalen pro abgebautem RSA-Molekül auf unspezifischere Reaktionen schließen.

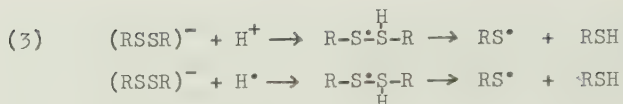
Da es für die Reduktion der Disulfide gleichgültig erscheint, ob sie durch eine Elektronenübertragung von organischen Radikalen oder durch das hydratisierte Elektron selbst erfolgt, kann der von Hoffman und Hayon (H3) angegebene Mechanismus angenommen werden. Demnach erfolgt in einem ersten Schritt die Anlagerung des Elektrons an den Schwefel:



Die Weiterreaktion ist pH-abhängig:



bei neutralem pH-Wert, sowie



bei saurem pH-Wert.

Endprodukt ist jeweils ein Thiyl-Radikal im Protein, das entweder in einer Radikal-Radikal-Reaktion zur Aggregation oder unter Disproportionierung zum Bruch der S-S-Brücke führen kann.

Für Rinderserumalbumin ist bekannt, daß 14 der 18 S-S-Gruppen oberflächlich liegen und leicht reduziert werden können. Entsprechend bestünde die Möglichkeit für beide Reaktionen, die Hoffman und Hayon angeben. Der Nachweis von Aggregaten in der vorliegenden Arbeit bestätigt die intermolekulare Form von Radikal-Radikal-Reaktionen. Ferner kann, wie bei der Aggregation unter N_2O , angenommen werden, daß es auch zu intramolekularer Quervernetzung kommt, wie sie deutlich an der breiten und abgeflachten Peakform zu erkennen ist. Die Gültigkeit beider Mechanismen zeigt auch die Tatsache, daß sie nach Reduktion, und der damit verbundenen Zerstörung der Disulfidbrücken, voll rückbildungsfähig sind.

Die beobachteten Bruchstücke könnten damit erklärt werden, daß Teile des Proteins, die über andere Mechanismen schon abgespalten worden sind, nur noch über Disulfidbrücken gebunden sind, und nach Disproportionierung der S-S-Brücken frei werden.

Neben der strahlenempfindlicheren Abbauphase des Hauptpeaks bis ca. 600 Gy, konnte in der vorliegenden Arbeit eine weniger strahlenempfindliche Phase bei weiter steigender Dosis festgestellt werden. Diese Beobachtung trifft sowohl für den sauren, wie für den alkalischen pH-Bereich zu. Da ein derartiger

Abbau auch nach Reduktion stattfindet, liegt, wie schon im Ergebnisteil vermutet, die Möglichkeit anderer Reaktionswege des Formiatradikals nahe. Auch hier liefern pulsradiolytische Messungen einige Lösungsansätze. Schüßler (S9) konnte zeigen, daß die Geschwindigkeitskonstante für die Reaktion des Formiatradikals mit der S-S-Gruppe bei einer Vorbestrahlungsdosis bis etwa 100 Gy stark zunimmt, dann aber stagniert, bzw. leicht abfällt. Die Messung der Ausbeute der S-S-Radikale ergab bei pH 7.5 ebenfalls einen starken Anstieg im Bereich bis 50 Gy, der dann aber auf diesem Niveau blieb, während bei der Messung im sauren pH-Bereich (6.3) die Ausbeute an S-S-Radikalen sogar wieder auf den Wert des nativen Serumalbumins zurückfiel. Schüßler (S7) nimmt an, daß dieser Abfall auf die bereits erfolgte Zerstörung der S-S-Brücken zurückzuführen ist. Dies ließe den Schluß zu, daß dem beschriebenen Abbau-mechanismus über S-S-Brücken tatsächlich nur im niedrigen Dosisbereich eine hohe Bedeutung zukommt, und daß bei höherer Dosis andere Reaktionen anzunehmen sind.

Die reduzierenden, d.h. elektronenübertragenden Eigenschaften der organischen Radikale, legen die Vermutung nahe, ihnen ähnliche Eigenschaften wie den hydratisierten Elektronen zuzuschreiben. Aus Angaben verschiedener Autoren (H3, F2, T1) ist bekannt, daß hydratisierte Elektronen eine hohe Geschwindigkeitskonstante mit Cystin (= Disulfid) ($k = 1.5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$), mit protonierten Histidinresten ($k = 3-4 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$) und mit der Peptidgruppe ($k = 1-3 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$) haben, wobei die niedrigere Geschwindigkeitskonstante mit der Peptidgruppe durch deren hohe Zahl im Protein ausgeglichen wird. Entsprechend diesen Angaben wäre also anzunehmen,

daß die beobachteten Veränderungen im höheren Dosisbereich auf Reaktionen der Formiatradikale mit diesen Gruppen zurückzuführen sind. Derartige Reaktionen folgen aber erst sehr viel später auf die zunächst ablaufenden Reaktionen mit den Disulfidgruppen. Diesem Vorgang entspricht die ausgeprägte Schulterbildung der Flächen-/Dosiskurve des Hauptpeaks nach Reduktion (siehe Abb. 20 und 27) mit praktisch unveränderten Molekülen im Dosisbereich bis 600 Gy.

Im Ergebnisteil wurde mehrfach betont, daß das Muster der Flächen-/Dosiskurven für den Hauptpeak und die Aggregatpeaks praktisch dem vor der Reduktion gleicht, lediglich um einen bestimmten Betrag in Richtung höhere Dosis verschoben. Für die Versuche ohne Reduktion konnte schon gezeigt werden, daß der Steilabfall der Hauptpeakkurve, bzw. Anstieg der Aggregatpeakkurven, auf eine spezifische Reaktion der Radikale mit S-S-Brücken zurückgeführt werden kann. Eine ähnlich steile Phase findet man aber auch in den Kurven nach Reduktion. Als Erklärung könnte folgendes Modell dienen.

Am Beginn der Bestrahlung übertragen die Formiatradikale in einer schnellen Reaktion ihr Elektron vorwiegend auf die oberflächlichen und leicht reduzierbaren S-S-Gruppen. Die Folge ist eine schnelle Aggregation und ein steiler Abbau im Hauptpeak, beides durch Reduktion voll reversibel. Es ist denkbar, daß mit steigender Dosis weiterhin S-S-Radikale gebildet werden und zwar auch an den S-S-Gruppen aggregierter Moleküle. Hinzu kommt, daß durch die bis dahin erfolgte Vorbestrahlung (siehe Pulsradiolyse) auch die tiefer gelegenen

S-S-Gruppen durch Auffaltung des Proteins zugänglich werden. Diese Radikale könnten aber durch ihre Lage im aggregierten Molekül am Zusammentreffen mit weiteren S-S-Radikalen gehindert sein. Verglichen mit Ergebnissen anderer Messungen ist man bei einer Dosis von 300-600 Gy bereits in einem Bereich, in dem Reaktionen mit Peptidbindungen und anderen Gruppen möglich sind. Aus diesen Gründen scheint es wahrscheinlich, daß es zur Ausbildung von C-S-Bindungen kommen kann. Sie sind dadurch gekennzeichnet, daß sie sich ähnlich schnell wie Disulfidbrücken, aber erst bei höherer Dosis bilden können, und durch Reduktion nicht mehr zerstört werden können.

Dieses Modell würde den Steilabfall in den Kurven nach Reduktion plausibel erklären. Sind, bei noch höheren Dosen, praktisch alle reduzierbaren Disulfidbrücken zerstört, durch unreduzierbare Bindungen ersetzt, oder eventuell durch räumliche Behinderung im Aggregat vor weiterem Angriff der Formiatradikale geschützt, dann laufen die oben diskutierten unspezifischen Reaktionen mit Histidinresten oder Peptidgruppen ab. Zu diesen unspezifischen Reaktionen zählt sicherlich auch die, bei den Eigenschaften der organischen Radikale erwähnte Fähigkeit zur H-Abstraktion. Hier kommt in erster Linie das H-Atom am C α -Atom neben der Peptidbindung in Frage, das am leichtesten unter Schaffung einer Radikalstelle entzogen werden kann. Diese Radikalstelle bietet somit weitere Möglichkeiten zur intra- und intermolekularen Quervernetzung.

Die Untersuchungen über den Einfluß von Äthanol-Radikalen auf Serumalbumin gingen zunächst von der

Annahme aus, daß, aufgrund ähnlicher Reaktionen mit den Primärradikalen, auch die Ergebnisse mit denen der Formiat-Untersuchungen vergleichbar wären. Es zeigt sich aber, daß bei alkalischem pH-Wert so gut wie keine, bei saurem pH erst ab sehr viel höheren Dosen als bei Formiat und N_2O Veränderungen zu sehen sind. Pulsradiolytische Messungen von Schüller können auch hier wieder Lösungsansätze liefern.

Die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten für die Übertragung des Elektrons vom Äthanolradikal auf die Disulfidgruppe des Serumalbumins ergab einen Wert von $1.3 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$, was einer fünfmal langsameren Reaktion als mit Formiatradikalen entspricht. Das bedeutet, daß, bei den hier vorliegenden Proteinkonzentrationen, nur 13 % der Äthanolradikale zur Reduktion der Disulfidgruppen beitragen. Könnte bei Formiat eine Erhöhung der Geschwindigkeitskonstanten mit Vorbestrahlung des Proteins erreicht werden, so gelingt dies mit Äthanolradikalen bei pH 7.3 praktisch nicht; lediglich bei pH 6.3 kam eine Erhöhung zustande, dann aber auch erst nach höherer Vorbestrahlungsdosis als bei Formiat. Die Messung der S-S-Radikalausbeute erweist sich nur als erfolgreich, wenn die Proteinkonzentration verdreifacht wird. Bei einer Proteinkonzentration von $1.5 \times 10^{-5} \text{ M}$ RSA kann nur eine geringe S-S-Radikalausbeute ohne pH-Unterschied gemessen werden.

Diese Untersuchungen bestätigen wiederum die Ergebnisse, die in der vorliegenden Arbeit gefunden wurden. Die Äthanolradikale reagieren weitaus weniger spezifisch mit den Disulfidgruppen, so daß kein Unterschied zwischen Bestrahlungsprodukten vor und nach Reduktion gefunden werden konnte. Damit ist anzu-

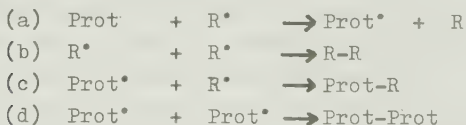
nehmen, daß für Äthanolradikale überwiegend die Mechanismen gelten, die für Formiatradikale im höheren Dosisbereich postuliert wurden, d.h. also Reaktionen mit protoniertem Histidin, aromatischen Aminosäuren und Peptidgruppen, sowie die Eigenschaft zur H-Abstraktion. Diese Reaktionen laufen aber bei Äthanol erst bei sehr viel höheren Dosen ab, verglichen mit den Ergebnissen unter Formiat. Schüßler (S8) konnte mit ^{14}C -markiertem Äthanol, bzw. Formiat, Aussagen über das Bindungsverhalten dieser Radikale treffen. Dabei wurde beobachtet, daß sich sowohl Äthanol als auch Formiat nach Bestrahlung an Serumalbumin binden. Durch Inkubation mit SDS und Zusatz von Mercaptoäthanol konnte ferner bewiesen werden, daß die Bindung zwischen organischen Radikalen und Serumalbumin kovalenter, nicht schwefelbrückenbedingter Natur ist. Die Menge des jeweils gebundenen Radikals unterschied sich aber in beträchtlichem Ausmaß. So konnte, z.B. nach einer Dosis von 1700 Gy, gezeigt werden, daß 4.2 % aller gebildeten Formiat-, aber 11.4 % der Äthanolradikale kovalent gebunden werden.

Ausgehend von diesen und anderen Beobachtungen ergeben sich fünf mögliche Erklärungen für das unterschiedliche Verhalten der Formiat- und Äthanolradikale (S2):

- 1) Das Formiatradikal $\text{CO}\cdot\text{O}^-$ ist ein Anion und unterliegt damit einer größeren elektrostatischen Anziehungskraft an das Proteinmolekül als das ungeladene Äthanol. Diese Wechselwirkung vergrößert sich mit sinkendem pH-Wert, da die positive Ladung des Proteins zunimmt.
- 2) Das Formiatradikal ist kleiner als das Äthanolradikal. Daher bestünde die Möglichkeit, daß es

noch Gruppen im Protein erreichen kann, die dem Äthanolradikal unzugänglich sind.

- 3) Hoffman und Hayon (H3) konnten eine Zunahme der Reduktion des Lysozyms mit steigender Ionenstärke der Lösung nachweisen. Der Zusatz von Formiat in Form seines 10^{-1} M Natriumsalzes läßt auch an diese Möglichkeit denken.
- 4) Die unterschiedlich hohen Geschwindigkeitskonstanten der beiden Radikale für die Übertragung ihres Elektrons begünstigen das Zustandekommen von kompetierenden Reaktionen. Folgende Kombinationen sind denkbar:



Es ist anzunehmen, daß die Zahl der Radikale bei einer hohen Geschwindigkeitskonstante für die Elektronenübertragung (z.B. Formiat) rasch abnimmt, dabei die Zahl der Proteinradikale schnell zunimmt und die Reaktion (d), also Proteinquervernetzungen, bevorzugt stattfindet. Umgekehrt steht bei Radikalen mit langsamer Elektronenübertragung (z.B. Äthanol) eine hohe Zahl von Radikalen einer niedrigen Zahl von Proteinradikalen gegenüber, so daß bevorzugt Rückbildungsreaktionen (b) oder Protein-Radikalreaktionen (c) zu erwarten sind. Die hohe Bindungsrate des Äthanol an das Serumalbumin (siehe oben) unterstreicht die Bedeutung der Reaktion (c). Entsprechend kann man, wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, keine oder nur geringe Aggregation nachweisen.

- 5) Das Redoxpotential des Äthanolradikals ist wesent-

lich kleiner, verglichen mit dem des Formiatradikals. Damit kann es weniger Gruppen im Protein reduzieren als das Formiatradikal.

Faraggi et al. (F3) nehmen für hydratisierte Elektronen einen Mechanismus an, bei dem diese zunächst oberflächliche Gruppen angreifen. In einem zweiten Schritt erfolgt die Auffaltung des Proteinmoleküls, wobei gleichzeitig die Elektronen in das Innere des Proteins wandern, um dort mit Aminosäureresten oder Disulfidgruppen zu reagieren. Auch für Formiatradikale, mit einem ähnlich negativen Redoxpotential, wäre ein derartiger Mechanismus denkbar. Dem widerspricht aber, zumindest was den Einfluß des Formiatradikals betrifft, die Beobachtung, daß sowohl die Geschwindigkeitskonstante für die Übertragung des Elektrons vom Formiat auf das Protein, als auch die Ausbeute an S-S-Radikalen mit Vorbestrahlung des Proteins zunimmt. Man muß annehmen, daß in einem solchen Fall eine Elektronenwanderung langsamer als in einem gefalteten Protein erfolgen sollte. Auch die beobachtete Reaktion der Formiat- und Äthanolradikale spricht gegen diese Theorie, wenn man deren unterschiedliches Verhalten mit der Molekülgröße als Angriffshindernis für räumlich unzugängliche Gruppen begründet (S8).

4.4. pH-Abhängigkeit der Reaktionen und Aggregatverhalten

Die strahleninduzierten Veränderungen am Serumalbumin wurden für sämtliche Versuchsbedingungen bei zwei verschiedenen pH-Werten untersucht. Dabei

konnten grundsätzlich verstärkte Modifikationen, d.h. Abbau des Hauptpeaks und Ausbildung hochmolekularer Aggregate, bei geringen Energiedosen und niedrigem pH-Wert beobachtet werden, während bei alkalischem pH-Wert diese Veränderungen erst bei höheren Energiedosen abliefen.

Schon Brustad (B2) untersuchte 1966 die Strahlenempfindlichkeit von Lysozym bei Bestrahlung unter N_2O in Abhängigkeit vom pH-Wert. Dabei konnte er ein Minimum der Empfindlichkeit im pH-Bereich von 6 - 8 beobachten, während sie im sauren und alkalischen Bereich wieder anstieg. Als Ursache vermutete er Ladungsänderungen der Aminosäurereste im Enzym, verbunden mit geänderter Reaktivität dieser Reste mit den Radiolyseprodukten.

Adams (A1) erhält bei Bestrahlung von Ribonuklease unter N_2O ähnliche Ergebnisse, nämlich ein Minimum der Strahlenempfindlichkeit bei pH 4-5 mit einem Anstieg bei steigendem, bzw. weiter fallendem pH-Wert. Er begründet diese Beobachtung zum einen wiederum mit einer Änderung im Reaktionsverhalten der OH-Radikale gegenüber den Aminosäureresten, zum anderen mit dem Einfluß zusätzlich entstehender H-Radikale bei stark saurem pH-Wert. Ein Vergleich der Transient-Spektren für die Anlagerung des OH-Radikals an Ribonuklease zeigt im Alkalischen eine große Ähnlichkeit mit dem Spektrum für die Reaktion des OH-Radikals mit der Aminosäure Tyrosin. Dies führt ihn zu dem Schluß, daß der OH-Radikalangriff auf diese Aminosäure als eine Erklärungsmöglichkeit für die pH-Abhängigkeit dienen könnte.

Auch Mee und Adelstein (M1) bestätigen den pH-Effekt bei Ribonuklease und führen dies vornehmlich auf den verstärkten Einfluß der H-Radikale zurück, wobei Konfigurationsänderungen des Proteinmoleküls in

ihren Augen keine Rolle spielen.

Die bisher zitierten Arbeiten beschränken sich auf pH-abhängige Reaktionen der OH- und H-Radikale. Hoffman und Hayon (H3) können eine pH-Abhängigkeit auch für die Reaktion des Formiatradikals mit Lysozym unter N_2O -Bedingungen nachweisen. Ihre Messungen ergeben eine Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit mit sinkendem pH-Wert. Im alkalischen Bereich steigt diese aber entgegen den bisherigen Beobachtungen nicht weiter an, sondern fällt weiter ab. Als mögliche Erklärung führen sie Ladungsverschiebungen der funktionellen Gruppen in Form von Protonierung-Deprotonierung an. In Frage kommen dafür die Carboxyl- bzw. Aminogruppen in den Seitenketten der Aminosäuren, die Phenolgruppen des Tyrosins sowie Histidin. Beide Autoren lehnen aber, wie schon die Verfasser der oben erwähnten Artikel, größere Konformationsänderungen des Proteinmoleküls als Ursache für die pH-abhängige Reaktionsgeschwindigkeit der Radikale mit dem Protein ab.

Demgegenüber zeigen Untersuchungen von Foster (F4), daß es offensichtlich doch pH-abhängige Veränderungen in der Tertiärstruktur des Serumalbumins gibt. Er nimmt an, daß es sogenannte Übergänge von einer Konfiguration in eine andere gibt, wobei eine dieser Konfigurationsänderungen in den Bereich zwischen pH 6 und pH 8 fällt; Messungen der optischen Rotation führt er als Hinweis für diese Veränderungen an. Gleichzeitig beobachtet er, daß mehrere Imidazolgruppen des Serumalbumins in der alkalischen Konfiguration titrierbar sind, während dies im anderen Fall nicht möglich ist.

Die in der vorliegenden Arbeit gefundene pH-Abhängigkeit der Meßergebnisse steht somit in guter Überein-

stimmung mit Untersuchungen an anderen Proteinen. Anhand der Auswertung zweier pH-Werte läßt sich aber keine Aussage darüber treffen, ob das Reaktionsverhalten des Serumalbumins mehr mit den Beobachtungen Hoffman und Hayons am Lysozym übereinstimmt (= ausschließliche Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit bei steigendem pH-Wert), oder ob ein Verhalten, wie es bei Ribonuklease gefunden wurde, zutrifft (Minimum der Reaktionsgeschwindigkeit im Neutralen mit Anstieg sowohl zum Säuren, wie zum Alkalischen).

Folgende Möglichkeiten bieten sich demnach zur Erklärung der pH-Abhängigkeit der Ergebnisse an:

- 1) Eine Zunahme der H-Radikalausbeute im sauren Bereich könnte deren Einfluß auf das Protein erhöhen. Diese Möglichkeit erscheint allerdings angesichts des nur geringen pH-Sprunges wenig bedeutsam und würde nur für die N_2O -Versuche gelten.
- 2) Ladungsverschiebungen im Protein, d.h. also eine stärkere Positivladung des Proteins im sauren Bereich, erhöht die Reaktionsgeschwindigkeit der Radikale mit dem Protein. Eine ausgeprägte Rolle scheint dieser Mechanismus für die Elektronenübertragung des Formiatradikals zu spielen.
- 3) Eine Konfigurations-Änderung, wie sie in diesem Bereich diskutiert wird, könnte bei niedrigem pH-Wert Proteingruppen für den Radikalangriff zugänglich machen, die im Alkalischen aus räumlichen Gründen nicht, oder nur teilweise, erreicht werden können. Ein derartiger Mechanismus, nämlich ein konfigurationsbedingter Angriff auf bestimmte Gruppen im Protein, wäre auch für die

Abspaltung eines Teilpeaks aus dem Hauptpeak zu überlegen, die im Alkalischen, vorwiegend nach Reduktion, beobachtet wurde.

Für die Möglichkeit der Aggregatentstehung wurden bereits mehrere Lösungswege angegeben. Sämtliche Mechanismen erschöpfen sich allerdings im Problem der Entstehung, machen aber keine Aussagen über das Verhalten der Aggregate. Bei dem in dieser Arbeit vorgegebenen Bestrahlungssystem handelt es sich um eine "steady-state"-Radiolyse. Das bedeutet, daß die Dosis nicht in Form eines einzigen Bestrahlungsimpulses, sondern über einen Zeitraum verteilt (1, bzw. 3 Stunden), appliziert wurde. Hierdurch bestand die Möglichkeit, durch Probenentnahme während der Bestrahlung, "Einblick" in die Veränderungen bis zur Gesamtdosis zu bekommen. Nicht zuletzt durch pulsradiolytische Messungen wurde gezeigt, daß sich Geschwindigkeitskonstanten und damit Reaktionsmöglichkeiten beträchtlich ändern können, wenn man die Messungen nach Vorbestrahlung durchführt. Infolgedessen darf man annehmen, daß sich die Reaktionswahrscheinlichkeiten zwischen Radikalen und den Proteinmolekülen im Verlauf der Bestrahlung ändern können. Liegen, zum Beispiel, zu Beginn der Bestrahlung vorwiegend Proteinmonomere vor, ist die Reaktionswahrscheinlichkeit eines Radikals mit einem Monomer hoch. Zu einem späteren Bestrahlungszeitpunkt liegt, wie auch die Elektropherogramme zeigen, ein Teil der Proteinmoleküle bereits als Aggregat (z.B. Dimer) vor, so daß sich jetzt die Reaktionswahrscheinlichkeit eines Radikals mit einem Monomer zugunsten einer Reaktion mit einem Dimer verschiebt. Geht man davon aus, daß Dimer-Radikale mit Monomer-Radikalen oder wiederum mit

Dimer-Radikalen reagieren können, so hätte man eine gute Erklärung für das Zustandekommen der Dreiergruppen bei den beobachteten Aggregatpeaks. In diesem Sinne wurde im Ergebnisteil bereits versucht, ein dynamisches Konzept in Form eines Fluß-Modells zu erstellen, das den Auf- und Abbau von Aggregatpeaks verstehen hilft. Angesichts obiger Überlegungen scheint dieses Modell einigermaßen sinnvoll. Säulenchromatographische Untersuchungen von Mee und Adelstein (M1) zur Auftrennung der Bestrahlungsprodukte von Ribonuklease ergaben unter N_2O -Bedingungen ein nahezu identisches Aggregatverhalten, verglichen mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Sie bestätigen damit, daß bei derartigen Messungen nicht nur die Wirkung einer Einzeldosis interessiert, sondern daß es auch wichtig ist, Veränderungen als Folge kontinuierlicher Strahleneinwirkung zu untersuchen.

4.5. Wertung

Die Bestrahlung von Serumalbumin mit Röntgenstrahlen zeigt deutlich, welche komplexe Vorgänge in diesem System ablaufen. Selbst die Einwirkung nur einer einzigen Radikalsorte bietet immer noch viele Möglichkeiten, die stattfindenden Reaktionen zu interpretieren. Endgültige Aussagen über die Strahlenwirkung auf Zellen scheinen daher erst möglich zu sein, wenn man mehr über die strahleninduzierten Reaktionen der zellulären Bausteine, wie Aminosäuren und Proteine, weiß. An den Ergebnissen dieser Arbeit sieht man auch, daß nicht nur die DNA einer Zelle

als Angriffspunkt für die Strahlung dienen kann, sondern sämtliche anderen Zellbestandteile ebenfalls. Ferner ist zu beachten, daß neben den Primärradikalen auch sekundär entstehende Radikale zu Veränderungen an den Zellbestandteilen führen können.

Die Anwendung der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese zur Auftrennung der Bestrahlungsprodukte erwies sich als sehr empfindliches Verfahren zum Nachweis kleinster Proteinmengen. Die Auswertung der Meßdaten mit Hilfe eines Rechners, die in dieser Arbeit praktisch von Beginn an routinemäßig eingesetzt werden konnte, ermöglichte es, viele Ergebnisse auch quantitativ darzustellen.

Speziell der Ausbau des rechnergestützten Auswertesystems wird in Zukunft die strahlenbiologischen Untersuchungen beschleunigen, vereinfachen und zu präziseren Meßergebnissen führen.

5. Zusammenfassung

Rinderserumalbumin (RSA) wurde in einer Konzentration von $1,5 \times 10^{-5}$ Mol/l in 10^{-3} M Natriumphosphatpuffer gelöst und einer Röntgenbestrahlung mit Energiedosen bis zu 1760, bzw. 5280 Gy ausgesetzt. Die Bestrahlung erfolgte in einer N_2O -Gasatmosphäre, mit und ohne Zusatz von Formiat und Äthanol, beide in einer Konzentration von 10^{-1} Mol/l. Die Bestrahlungsprodukte wurden mit Hilfe der SDS-Polyacryamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) auf 7.5 % - Gelen, ohne und mit Reduktion durch Mercaptoäthanol, aufgetrennt. Die mit Coomassie Brilliant Blue R 250 gefärbten Gele wurden bei 500 nm Wellenlänge photometrisch untersucht, die Extinktionsdaten auf Lochstreifen gespeichert und mit Hilfe eines Rechners quantitativ ausgewertet. Das Molekulargewicht der Bestrahlungsprodukte konnte über einen Vergleich mit Eichproteinen bekannten Molekulargewichts abgeschätzt werden.

Die Bestrahlung von Rinderserumalbumin führte zu folgenden Ergebnissen:

Unter N_2O erfolgt, vorwiegend durch Reaktionen der OH-Radikale, ein kontinuierlicher Abbau der Proteinmoleküle mit gleichzeitiger Bildung von Aggregaten, die als Dimere, Trimere und Tetramere identifiziert werden konnten. Die Reduktion der Bestrahlungsprodukte erbrachte keinen Hinweis auf eine bevorzugte Stabilisierung dieser Aggregate über Disulfidbrücken.

Der Zusatz von Formiat und Äthanol zur RSA-Lösung ermöglichte es, den Einfluß der entsprechenden Sekundärradikale auf das Protein zu beobachten. Dabei konnte für Formiatradikale schon bei sehr niedri-

gen Dosen eine spezifische Reaktion mit den Disulfidbrücken im Serumalbumin nachgewiesen werden. Diese Modifikationen waren zunächst durch Reduktion voll reversibel und wurden im höheren Dosisbereich von anderen Reaktionen abgelöst, die durch Reduktion nicht mehr aufgehoben werden konnten. Die Aggregation entsprach dem Muster, wie es unter N_2O gefunden wurde. Der Zusatz von Äthanol senkte die Strahlenempfindlichkeit, in Bezug auf Aggregation, in erheblichem Maß, so daß wesentlich höhere Dosen als bei den vorangegangenen Bedingungen erforderlich waren, um Veränderungen zu sehen. Auch konnte keine spezifische Reaktion der Äthanolradikale mit Disulfidbrücken beobachtet werden, wie dies unter Zusatz von Formiat der Fall war. Für alle Versuchsbedingungen gilt, daß die Veränderungen bei niedrigem pH-Wert schon nach geringeren Bestrahlungsdosen zu beobachten waren als beim alkalischen pH-Wert.

6. Literaturverzeichnis

- A1 Adams, G.E., Willson, R.L., Bisby, R.H.,
Cundall, R.B.
Int. J. Radiat. Biol. 20, 405 (1971)
- A2 Adams, G.E., Redpath, J.L., Bisby, R.H.,
Cundall, R.B.
Israel Journal of Chemistry 10, 1079 (1972)
- A3 Adams, G.E., Willson, R.L., Aldrich, J.E.,
Cundall, R.B.
Int. J. Radiat. Biol. 16, 333 (1969)
- B1 Boguta, G., Danciewicz, A.M.
Int. J. Radiat. Biol. 39, 163 (1981)
- B2 Brustad, T.
Radiation Research 27, 456 (1966)
- B3 Breitenkamp, M., Henglein, A., Lilie, J.
Berichte der Bunsengesellschaft 80, 973 (1976)
- C1 Collins, R.C., Haller, W.
Anal. Biochem. 54, 47 (1973)
- F1 Fazekas de St. Groth, S., Webster, R.G.,
Datyner, A.
Biochem. biophys. Acta 71, 377 (1963)
- F2 Faraggi, M., Bettelheim, A.
Radiation Research 71, 311 (1977)
- F3 Faraggi, M., Klapper, M.H., Dorfman, L.M.
Biophys. J. 24, 307 (1978)
- F4 Foster, J.F.
In: Albumin Structure, Function and Uses
Rosenoer, V.M., Oratz, M., Rothschild, M.A.
Pergamon Press, New York (1977)

- G1 Garrison, W.M.
Radiation Research Review 3, 305 (1972)
- H1 Henglein, A.
Einführung in die Strahlenchemie
Verlag Chemie (1969)
- H2 Hoffman, M.Z., Hayon, E.
J. Am. chem. Soc. 94, 7950 (1972)
- H3 Hoffman, M.Z., Hayon, E.
The Journal of Physical Chemistry 79, 1362 (1975)
- H4 Hashimoto, S., Hiroshi, S., Takahiro, M.,
Masashi, I, Masaharu, K.
Int. J. Radiat. Biol. 40, 31 (1981)
- J1 Jakubick, V., Delincée, H.
Z. Naturforsch. 33c, 203 (1978)
- L1 Liebster, J., Kopoldova, J.
Radiat. Res. 27, 162 (1966)
- L2 Lilie, J., Beck, G., Henglein, E.
Ber. Bunsenges. phys. Chem. 75, 458 (1971)
- M1 Mee, L.K., Adelstein, S.J., Stein, G.
Radiation Research 52, 588 (1972)
- P1 Peters, T.
The Plasma Proteins
2nd Ed., Vol. I, F.W. Putnam Ed.
Acad. Press, New York (1975)
- P2 Pitt-Rivers, R., Impiombato, S.A.
Biochem. J. 109, 825 (1968)
- R1 Reynolds, J.A., Tanford, C.
Proc. Nat. Acad. Sci. 66, 1002 (1970)
- R2 Reynolds, J.A., Tanford, C.
J. Biol. Chem. 245, 5161 (1970)

- S1 Schüssler, H.
Med. Hab.-Schr., Erlangen-Nürnberg (1976)
- S2 Schüssler, H., Davies, J.V.
Arbeitsbericht (1981)
- S3 Simic, M., Neta, P., Hayon, E.
J. Amer. Chem. Soc. 92, 4763 (1970)
- S4 Shirahama, K., Tsujii, K., Takagi, T.
J. Biochem. 75, 309 (1974)
- S5 Schilling, K.
Med. Diss., Erlangen-Nürnberg (in Vorbereitung)
- S6 Schüssler, H.
Vortrag 6. Int. Congress of Rad. Res.
Tokyo (1979)
- S7 Schüssler, H.
Report on Measurements (1980)
- S8 Schüssler, H.
Int. J. Radiat. Biol. 40, 483 (1981)
- S9 Schüssler, H., Davies, J.V.
Int. J. Radiat. Biol. (im Druck)
- T1 Tal, Y., Faraggi, M.
Radiat. Ras. 62, 337 (1975)
- W1 Winter, G.
Med. Diss., Erlangen-Nürnberg (1982)
- W2 Weber, K., Osborn, M.
The Proteins
3rd Ed., Vol. I, Acad. Press, New York (1975)
- Y1 Yamamoto, O.
Rad. Res. 54, 398 (1973)
- Y2 Yamamoto, O.
Radiat. Res. 61, 251 (1975)

Z1 Zahn, H.T.

Med. Diss., Erlangen-Nürnberg (1976)

7. Anhang

Beschreibung des Korrekturprogramms KORRIG

Die Programmreihe KORRIG wurde zunächst mit dem Ziel erstellt, negative Extinktionswerte, die in Form nichtnumerischer Zeichen (<<<<) durch den Analog-Digital-Wandler ausgegeben wurden, durch den Wert 0000 zu ersetzen. Dies war notwendig, um Störungen im Ablauf des Flächenprogramms MONTE zu verhindern. Die Möglichkeit, weitere Korrekturen durch das Programm ausführen zu lassen, wurde durch Erweiterung auf insgesamt sechs Programmversionen genutzt, wobei jede Programmversion, ausgehend von der Negativwert-Korrektur, mit einer zusätzlichen Programmstufe erweitert wurde. Die letzte Stufe, das Programm KORRIG 6, soll im folgenden beschrieben werden, da es die umfangreichste Version darstellt. Zur Ergebnisberechnung dieser Arbeit wurde auf das Löschen der Version 1 bis 5 verzichtet, um bei kleineren Datenkorrekturen auf diese kürzeren Programme zurückgreifen zu können. Die Beschreibung erfolgt anhand des beiliegenden Flußdiagramms.

1. Versuchsnummer einlesen

Nach Aufrufen des Programms erfolgt durch Bedienung die Eingabe des File-Namens. Dieser setzt sich, wie beschrieben, aus der Versuchs- und der Gelnummer zusammen und ist zweimal nacheinander einzugeben. Mit dieser Angabe wird der zu korrigierende Datensatz aufgesucht und gleichzeitig ein Speicherbereich für die korrigierten Daten auf der Magnetplatte reserviert.

2. Überschrift drucken

War die Suche nach dem gewünschten File erfolgreich, so wird im nächsten Schritt der File-Name sowie die gewählte Programmversion auf dem Bildschirm ausgegeben; zum Beispiel:

```
VERSUCH 001 GEL 01   PROGRAMM KORRIG
```

3. Vergleich der Werte

In diesem Abschnitt erfolgt die Korrektur der negativen Extinktionswerte. Dabei wird zunächst jeder Extinktionswert untersucht, ob er mit der Zeichenfolge <<<< identisch ist. Im positiven Fall werden die Klammern durch "0000" ersetzt und anschließend der nächste Extinktionswert untersucht; im negativen Fall geschieht dies sofort. Die korrigierten Werte werden unter Angabe der dazugehörigen File-Adresse mit der Überschrift "KORRIGIERTE NEGATIVWERTE" ausgegeben. Damit besteht gleichzeitig eine externe Kontrolle über die Lage der Negativwerte im oder außerhalb des Gels (evtl. Beschädigung, Wasserblase, etc.).

4. Korrektur von Front und Gelanfang

Dieser und die folgenden Programmteile erfordern jeweils eine positive Antwort (= "J"), um ausgeführt zu werden. Keine oder eine andere Eingabe bewirken, daß dieser Programmabschnitt übersprungen und der Programmablauf entsprechend verkürzt wird. Die Korrektur Eingaben erfolgen in einem Dialogsystem mit dem Rechner, wobei auf entsprechende Fragen die Adressen mit den neuen Extinktionswerten angegeben werden müssen. Die Korrektur von Front und Gelanfang ist insofern notwendig, als die Berechnung der Peaks im

Gel in Form einer Peakgruppe mit einer gemeinsamen Grundlinie zwischen Front und Gelanfang erfolgte.

5. Korrektur weiterer Werte

Dieser Programmabschnitt unterscheidet sich prinzipiell nicht von dem vorangegangenen. Er wurde aufgenommen, um Einzelwerte im Datensatz durch Angabe von Adresse und Wert korrigieren zu können. Damit können Extinktionsänderungen ausgebessert werden, die durch bisweilen vorkommende Unreinheiten oder Kratzer im Gel verursacht werden. Selbstverständlich besteht die Möglichkeit, Änderungen am Wert für die Front oder den Gelanfang auch in dieser Programmstufe vorzunehmen. Die Dialogform mit dem Rechner ist in Form einer Schleife so gewählt, daß nach Eingabe einer Korrektur solange nach weiteren Korrekturen gefragt wird, bis keine positive Antwort mehr gegeben wird.

6. Korrektur von Abschnitten

Für die Ausgabe der Elektropherogramme auf dem Plotter war es erwünscht, die Abschnitte vor der Gelfront (= Gel-Wasserübergang etc.), in Form unregelmäßiger Extinktionszacken, durch eine gerade Linie zu ersetzen. Dieser Programmabschnitt erlaubt die Korrektur der Extinktionswerte zwischen zwei frei wählbaren Adressen auf einen vorbestimmten Wert. In der Regel wurde dafür der Wert für die Front eingesetzt, so daß in der Zeichnung der Kurvenabschnitt vor der Front in dieser Höhe lag. Auch hier unterbricht erst eine Negativantwort die Frage nach weiteren Abschnittskorrekturen.

7. Höhenkorrektur I

Geringfügige Schwankungen in den Versuchsbedingungen (Entfärben der Gele, Photometereinstellung etc.) bewirkten, daß sich die Grundextinktion der Gele beim Vergleich verschiedener Versuche voneinander unterschied. Dies hatte zur Folge, daß die Elektropherogramme in der Zeichnung unterschiedlich hoch lagen und damit schwerer vergleichbar waren. Der Abschnitt "Höhenkorrektur I" ermöglicht, in einem wählbaren Gelabschnitt, sämtliche Extinktionswerte um einen ebenfalls frei wählbaren Betrag nach oben oder unten zu korrigieren. In der Regel wurde dazu zum gesamten Datensatz, je nach Höhenlage der Grundlinie, ein zuvor errechneter Wert addiert oder subtrahiert.

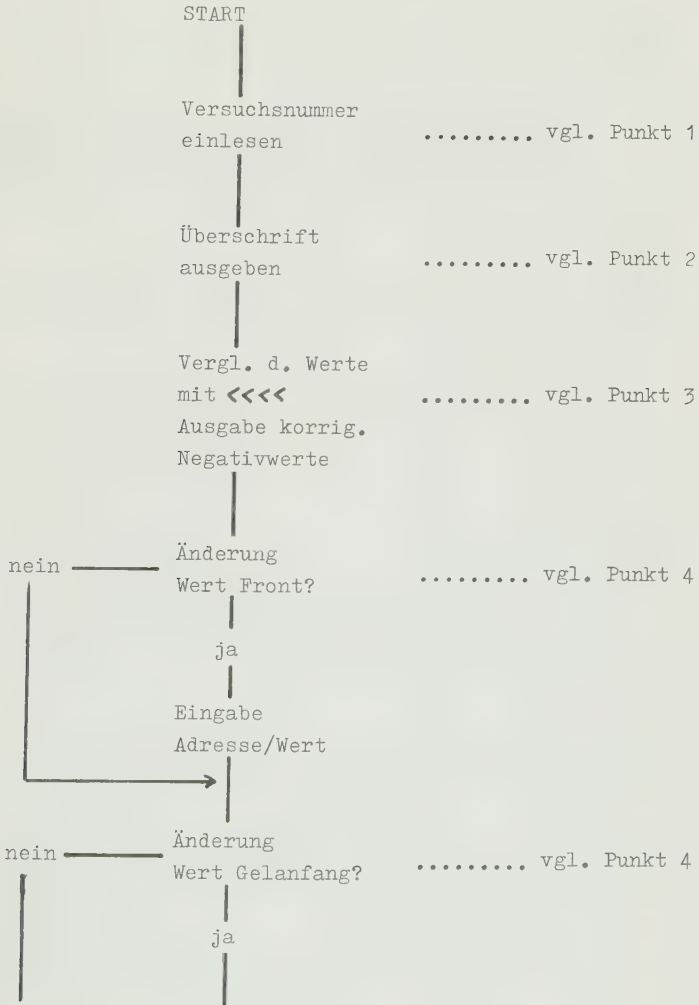
8. Höhenkorrektur II

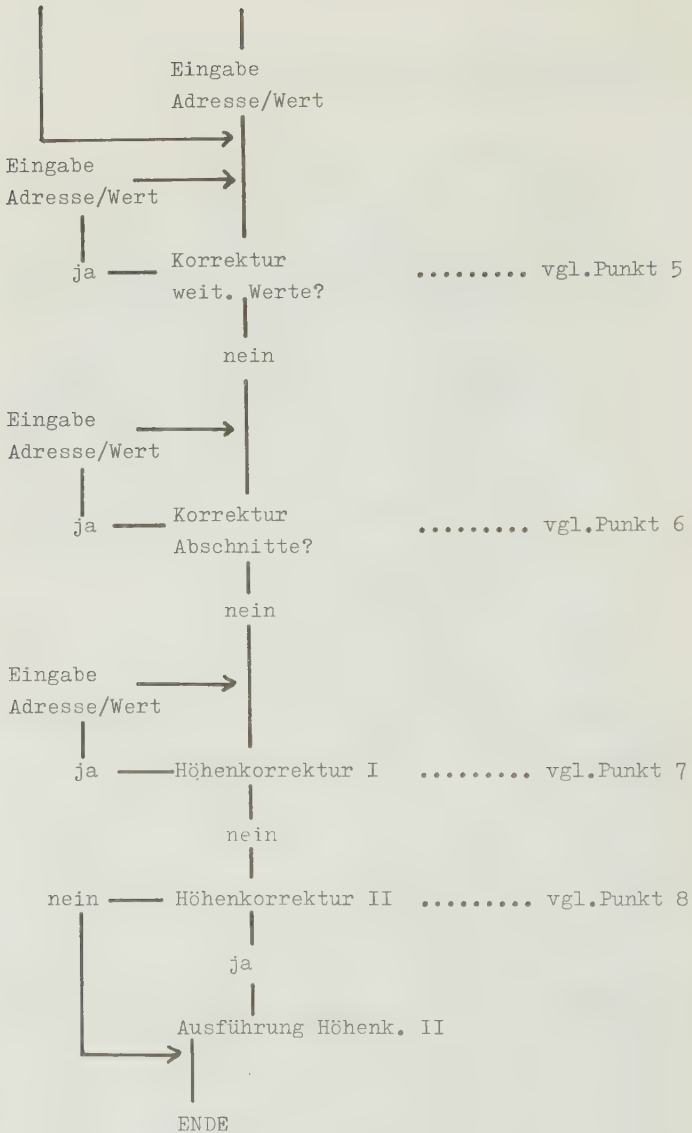
Die oben beschriebene Höhenkorrektur erwies sich insofern als nachteilig, als die Differenz zwischen vorhandener und gewünschter Höhenlage der Kurve von Hand berechnet werden mußte. Der Abschnitt "Höhenkorrektur II" ist daher so ausgelegt, daß der Rechner die Differenz zwischen eingegebenem Frontwert (s. Punkt 4) und einem fest im Programm vorgegebenem Wert (= 0050) bildet und diesen Betrag vom gesamten Datensatz subtrahiert, bzw. dazuaddiert. Damit konnte erreicht werden, daß sämtliche Kurven, die gezeichnet werden sollten, mit ihrer Front einheitlich von einer Höhenlage ausgingen und direkt miteinander vergleichbar wurden. Zur Ausführung dieses Programmabschnitts genügt die positive Quittierung der Frage "Grundliniennivellierung". Technisch bedingte Voraussetzung ist allerdings, daß im gleichen Programmlauf der Wert für die Front (s. Punkt 4) eingelesen worden ist,

da diese Programmversion bei der Höhenkorrektur II darauf zurückgreift.

Mit KORRIG 6 steht ein Programm zur Verfügung, mit dem schnell und unkompliziert Veränderungen am Datensatz vorgenommen werden können. Es ist als Vorprogramm gedacht, dem sich die eigentliche Flächenberechnung anschließt. Schließlich muß aber vor der Gefahr gewarnt werden, durch unkritische Anwendung dieses Programms, den Datensatz und damit die Meßergebnisse übermäßig zu korrigieren und eine Verfälschung zu verursachen.

Flußdiagramm zum Programm KORRIG 6





Programm KORRIG 6 (FORTRAN)

```
$ PROGRAMM KORRIG 6          13.FEBRUAR 1981
C PROGRAMM ZUR KORREKTUR NEGATIVER WERTE, DER WERTE FUER FRONT
C UND GELANFANG, BELIEBIGER EINZELWERTE, KORREKTUR VON
C ABSCHNITTEN UND HOEHENKORREKTUR
C
C
C
C
C      INTEGER VERS(9),ADR,ANTW,POS,A,B,C,V,AA,EA,AD,ED,H,X,ADG,EDG
C      REAL WERT(250),PFEIL,ZAHL(50)
C      DATA PFEIL/'<<<<'/,POS/'J'/

C
C      WRITE(5,05)
C      CALL ASSIGN(8,'DAT.DAT',-1,'OLD')
C      CALL ASSIGN(15,'DAT.DAT',-1,'NEW')
C  VERSUCHSNUMMER EINLESEN
C      READ(8,10)VERS
C      WRITE(15,10)VERS
C      WRITE(5,20)VERS
C  UEBERSCHRIFT DRUCKEN
C      WRITE(5,30)
C  VERGLEICH DER WERTE
C      DO 1000 ADR=1,250,1
C      READ(8,60,END=1000,ERR=1000)WERT(ADR)
C      IF(WERT(ADR).NE.PFEIL)GOTO 2000
C      WERT(ADR)=0000.
C      WRITE(5,40)ADR,WERT(ADR)
C      GOTO 1000
2000  BACKSPACE 8
      READ(8,70)WERT(ADR)
1000  CONTINUE
C  KORREKTUR VON FRONT UND GELANFANG
C      WRITE(5,80)
C      READ(5,90)ANTW
C      IF(ANTW.NE.POS)GOTO 7000
C      WRITE(5,100)
C      READ(5,110)ADG,A
C      WERT(ADG)=A
7000  WRITE(5,150)
      READ(5,90)ANTW
      IF(ANTW.NE.POS)GOTO 7500
*
```

```
$      WRITE(5,100)
      READ(5,110)EDG,B
      WERT(EDG)=B
      CONTINUE
      REWIND 8
C      KORREKTUR WEITERER WERTE
7500   WRITE(5,160)
      READ(5,90)ANTW
      IF(ANTW.NE.POS)GOTO 8000
8500   WRITE(5,100)
      READ(5,110)ADR,C
      WERT(ADR)=C
      WRITE(5,170)
      READ(5,90)ANTW
      IF(ANTW.EQ.POS)GOTO 8500
      CONTINUE
C      KORREKTUR VON ABSCHNITTEN
      REWIND 8
8000   WRITE(5,180)
      READ(5,90)ANTW
      IF(ANTW.NE.POS)GOTO 8760
10000  WRITE(5,190)
      READ(5,200)AA,EA
      WRITE(5,210)
      READ(5,220)V
      DO 8750 ADR=AA,EA,1
      WERT(ADR)=V
8750   CONTINUE
      WRITE(5,230)
      READ(5,90)ANTW
      IF(ANTW.EQ.POS)GOTO 10000
      CONTINUE
      REWIND 8
C      HOEHENKORREKTUR
8760   WRITE(5,240)
      READ(5,90)ANTW
      IF(ANTW.NE.POS)GOTO 8125
11000  WRITE(5,190)
      READ(5,200)AD,ED
      WRITE(5,250)
      READ(5,260)H
      DO 8800 ADR=AD,ED,1
      WERT(ADR)=WERT(ADR)+H
8800   CONTINUE
      WRITE(5,270)
      READ(5,90)ANTW
      IF(ANTW.EQ.POS)GOTO 11000
      CONTINUE
```

*

```

$
C   HOEHENKORREKTUR II
8125  REWIND 8
      WRITE(5,280)
      READ(5,90)ANTW
      IF(ANTW.NE.POS)GOTO 8900
      X=A-0050
      DO 8850 ADR=ADG,EDG,1
      WERT(ADR)=WERT(ADR)-X
8850  CONTINUE
      REWIND 8
8900  DO 9000 ADR=1,250,1
      WRITE(15,50)ADR,WERT(ADR)
9000  CONTINUE
      STOP

C   FORMATE
05    FORMAT(' BITTE FILE-NAMEN ANGEBEN '//)
10    FORMAT(9A2)
20    FORMAT(1H ,9A2,5X,15HPROGRAMM KORRIG/)
30    FORMAT(1H,25HKORRIGIERTE NEGATIVWERTE:,:)
50    FORMAT(I3,2X,F6.0)
40    FORMAT(1X,I3,2X,F6.0)
60    FORMAT(6X,A5)
70    FORMAT(6X,F6.0)
80    FORMAT(' SOLL DER WERT FUEER DIE FRONT GEAENDERT WERDEN?')
90    FORMAT(A1)
100   FORMAT(' BITTE ADRESSE UND NEUEN WERT (I3,1X,I4) EINGEBEN:')
110   FORMAT(I3,1X,I4)
130   FORMAT(F6.0)
140   FORMAT(6X,F6.0)
150   FORMAT(' SOLL DER WERT FUEER DEN GELANFANG GEAENDERT WERDEN?')
160   FORMAT(' SOLLEN WEITERE WERTE KORRIGIERT WERDEN?')
170   FORMAT(' WEITERE KORREKTUREN?')
180   FORMAT(' SOLLEN ABSCHNITTE KORRIGIERT WERDEN?')
190   FORMAT(' BITTE ANFANGS- UND ENDADRESSE DES ABSCHNITTS ANGEBEN:')
200   FORMAT(I3,1X,I3)
210   FORMAT(' BITTE DEN EINZUSETZENDEN WERT ANGEBEN:')
220   FORMAT(I4)
230   FORMAT(' SOLLEN WEITERE ABSCHNITTE KORRIGIERT WERDEN?')
240   FORMAT(' SOLL EINE HOEHENKORREKTUR STATTFINDEN?')
250   FORMAT(' BITTE ZAHLENWERT (I4) ANGEBEN, (+/- MOEGLICH):')
260   FORMAT(I4)
270   FORMAT(' WEITERE HOEHENKORREKTUREN?')
280   FORMAT(' GRUNDLINIENNIVELLIERUNG?')
      END

```

*

Herrn Prof. Dr. Dr. H. Pauly danke ich für die Überlassung des Themas und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen an seinem Institut.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. H. Schüssler für ihre stets freundliche und tatkräftige Unterstützung. Durch ihre beispielhafte Betreuung hat sie wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Radiologie, deren Hilfe ich stets sicher war..

Nicht zuletzt möchte ich an dieser Stelle meinen Eltern danken, die mir durch ihre Unterstützung den Besuch der Universität und meine gesamte Ausbildung ermöglichten.

Lebenslauf

Am 1.11.1955 wurde ich in Tirschenreuth als Sohn des Sparkassenangestellten Georg Freundl und seiner Ehefrau Margot, geb. Scharf, geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule in Neunburg vorm Wald von 1962 bis 1966 und des neusprachlichen Gymnasiums in Nittenau, bestand ich im Juni 1975 das Abitur.

Meinen Wehrdienst leistete ich von 1975 bis 1976 in Regensburg, Neunburg vorm Wald und Hamm/Westf. ab.

Im Wintersemester 1976/77 begann ich an der Universität Regensburg das Studium der Pharmazie und wechselte zum Sommersemester 1977 an die Friedrich-Alexander-Universität Erlangen, wo ich das Studium der Humanmedizin aufnahm. Im Frühjahr 1979 legte ich das Physikum, ein Jahr später das 1. Staatsexamen ab. Nach Bestehen des 2. Staatsexamens im März 1982 leistete ich das Praktische Jahr an der Universität Erlangen ab. Im Mai 1983 beende ich mein Studium der Humanmedizin.

Seit dem 21. August 1981 bin ich mit meiner Ehefrau Monika, geb. Gerner, verheiratet.

